

JOÃO RICARDO MALERES ALVES COSTA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O USO DE
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM
TRAÍRA (*Hoplias malabaricus*, ERYTHRINIDAE):
 δ -ALAd, metalotioneína e vitelogenina**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, Departamento de Biologia
Celular, Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Biológicas com Área de Concentração
em Biologia Celular e Molecular.**

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de
Oliveira Ribeiro

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Helena
Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2006

PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

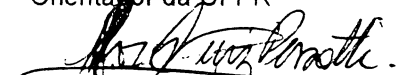
PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



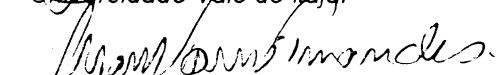
Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Orientador da UFPR



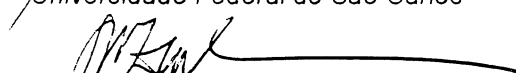
Dr. Marcos Luis Pessatti

Universidade Vale do Itajaí



Dr. Marisa Fernandes

Universidade Federal de São Carlos



Dr. Silvio Marques Zanata

UFPR



Dr. Célia Regina Cavichiolo Franco

UFPR

e tendo como suplentes,

Dr. Paulo Dalsenter

UFPR

após arguir o(a) doutorando(a) **João Ricardo Maleres Alves Costa** em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores em *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Teleostei)**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 31 de março de 2006



Célia Regina Cavichiolo Franco
Coordenadora do Curso

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	viii
LISTA DE TABELA E QUADRO	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
 <u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	 1
1 O USO DE BIOMARCADORES EM PEIXES	1
2 <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL	6
3 INTERAÇÕES ENTRE BIOMARCADORES	9
 CAPÍTULO I: BIOMARCADORES NO SANGUE DE TRAÍRA	 23
I.1 INTRODUÇÃO	24
I.1.1 INIBIÇÃO DA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE	24
I.1.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	26
I.2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
I.2.1 BIOENSAIOS	28
I.2.1.1 Experimento I	29
I.2.1.2 Experimento II	29
I.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA	30
I.2.2.1 Análises Estatísticas para δ -ALAd	32
I.2.3. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	33
II.2.3.1 Análises Estatísticas para os Parâmetros Hematológicos	34
I.3 RESULTADOS	35
I.3.1. ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA	35
I.3.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	39
I.4 DISCUSSÃO	40
 CAPÍTULO II: TEORES TECIDUAIS DE METALOTIONEÍNA EM TRAÍRA	 48
II.1 INTRODUÇÃO	49
II.2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
II.2.1 BIOENSAIO	51
II.2.2 QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE MT	51
II.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
II.3 RESULTADOS	53
II.4 DISCUSSÃO	56
 CAPÍTULO III: ESTUDOS COM A VITELOGENINA DE TRAÍRA	 59
III.1 INTRODUÇÃO	60
III.1.1 EXPRESSÃO DA VTG COMO BIOMARCADOR MOLECULAR	60
III.1.2 ÍNDICE VITELOGÊNICO	62
III.1.2.1 I_{VTG} para Populações Naturais	63
III.1.2.2 I_{VTG} para a Vitelogênese, com Fêmeas como Controle Referencial (I_{VTGf})	66
III.1.2.3 I_{VTG} para Bioensaios de Indução Experimental da VTG (I_{VTGe})	68
III.1.2.4 I_{VTG} para Ensaios <i>in vitro</i> de Estrogenicidade (I_{VTGh})	69
III.1.2.5 Considerações Gerais dos Índices	71
III.2 MATERIAIS E MÉTODOS	73
III.2.1 PRODUÇÃO DA VTG <i>IN VIVO</i> POR INDUÇÃO ESTROGÊNICA	73
III.2.1.1 Bioensaio	73
III.2.1.2 Isolamento da VTG Plasmática por Precipitação	74
III.2.2 ANTICORPOS POLICLONAIS PARA A IMUNO-DETECÇÃO	75
III.2.2.1 Produção de Anti-Soro contra VTG de <i>Hoplias malabaricus</i> (HOPL)	75
III.2.2.2 Imuno-Detecção por <i>Western Blot</i>	76

III.2.3 EFEITO DO CHUMBO SOBRE A EXPRESSÃO DA VTG <i>IN VIVO</i>	77
III.2.4 CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS E INDUÇÃO <i>IN VITRO</i>	78
III.2.4.1 Isolamento e Cultivo Primário de Hepatócitos	78
III.2.4.2 Indução Experimental da VTG <i>in vitro</i>	79
III.3 RESULTADOS	82
III.3.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA VTG <i>IN VIVO</i>	82
III.3.2 EFEITO DO CHUMBO SOBRE A EXPRESSÃO DA VTG <i>IN VIVO</i>	82
III.3.3 ESTROGENICIDADE <i>IN VITRO</i>	86
III.3.3.1 Análises das Amostras de Meio de Cultivo	86
III.3.3.2 Análises das Amostras de Hepatócitos do Macho (HPs♂)	89
III.3.4 APLICAÇÃO DO I _{VTG} PARA ESTROGENICIDADE <i>IN VITRO</i>	91
III.4 DISCUSSÃO	95
<u>CONCLUSÕES GERAIS</u>	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE 1 – PROTOCOLO EMPREGADO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd EREDITÓRIA	117
APÊNDICE 2 – PROTOCOLO EMPREGADO PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DA METALOTIONEÍNA EM BRÂNKUIAS E FÍGADO DE PEIXES	118
APÊNDICE 3 – PROTOCOLO EMPREGADO PARA O ISOLAMENTO DA VTG PLASMÁTICA POR PRECIPITAÇÃO	119
APÊNDICE 4 – PROTOCOLO EMPREGADO PARA SDS-PAGE, WESTERN BLOTTING E IMUNO-DETECÇÃO	120
ANEXO 1 – ESTUDOS COM A δ -ALAd DE PEIXES	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE ALGUMAS RESPOSTAS BIOMARCADORAS UTILIZADAS EM PEIXES	11
FIGURA 2 – ROTA DE SÍNTESE DO GRUPO HEME	12
FIGURA 3 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (PARCIALMENTE REDUZIDAS)	17
FIGURA 4 – AÇÃO CATALÍTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE	18
FIGURA 5 – AÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO CITOCROMO P450	19
FIGURA 6 – ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	83
FIGURA 7 – EFEITO AGUDO DO Pb ⁺⁺ <i>IN VIVO</i> (96 HORAS) SOBRE A PRODUÇÃO DE VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> , APÓS 15 DIAS DE INDUÇÃO COM 17 β -ESTRADIOL (E ₂)	84
FIGURA 8 – IMUNO-DETECÇÃO DA VITELOGENINA PRODUZIDA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> (ANTI)ESTROGENICIDADE <i>IN VITRO</i>	87
FIGURA 9 – ANÁLISE DO MEIO DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	88
FIGURA 10 – ANÁLISE PILOTO DO MEIO DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> FÊMEA	88
FIGURA 11 – ANÁLISE DAS CÉLULAS DO CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> MACHO, APÓS DEZ DIAS DE CULTIVO	90
FIGURA 12 – ÍNDICE VITELOGÊNICO PARA ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE ESTROGENICIDADE (I _{VTgh}): APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO (11)	94

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA DE SATURAÇÃO DE SUBSTRATO (δ -ALA) PARA A δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	37
GRÁFICO 2 – ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	37
GRÁFICO 3 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE TRAÍRA (<i>HOPLIAS MALABARICUS</i>) EXPOSTAS POR VIA TRÓFICA AO Pb ⁺⁺ E AO H ₃ C-Hg ⁺ , POR 70 DIAS (14 DOSES)	38
GRÁFICO 4 – CURVA PADRÃO (REGRESSÃO LINEAR) DE CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA ([GSH]) USADA COMO REFERÊNCIA NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> , POR INTERPOLAÇÃO	54
GRÁFICO 5 – TEORES TECIDUAIS DE SULFIDRILA (nmol de -SH) POR UNIDADE DE MASSA DA AMOSTRA DE FÍGADO (g) DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A 75 ng H ₃ C-Hg ⁺ .g ⁻¹ DE BIOMASSA, POR 70 DIAS (14 DOSES)	54
GRÁFICO 6 – CURVA PADRÃO (REGRESSÃO LINEAR) DE CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA ([GSH]) USADA COMO REFERÊNCIA NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BRÂNQUIAS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> , POR INTERPOLAÇÃO	55
GRÁFICO 7 – TEORES TECIDUAIS DE SULFIDRILA (nmol de -SH) POR UNIDADE DE MASSA DA AMOSTRA DE BRÂNQUIA (g) DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A 75 ng H ₃ C-Hg ⁺ .g ⁻¹ DE BIOMASSA, POR 70 DIAS (14 DOSES)	55
GRÁFICO 8 – CITOMETRIA DE FLUXO APÓS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	93

LISTA DE TABELA E QUADRO

TABELA 1 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ANALISADOS EM <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> APÓS EXPOSIÇÃO TRÓFICA ÀS DOSES DE 75 ng H ₃ C-Hg ⁺ .g ⁻¹ E 21 µg Pb ⁺⁺ .g ⁻¹ , A CADA 5 DIAS, POR UM PERÍODO TOTAL DE 70 DIAS (14 DOSES).....	39
QUADRO 1 –INTERAÇÕES RECÍPROCAS ENTRE DUAS RESPOSTAS BIOLÓGICAS OBTIDAS COMO BIOMARCADORES.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

17α-EE ₂ (ou EE ₂)	– 17α-etinil-estradiol: C ₂₀ H ₂₄ O ₂
δ-ALAd	– δ-aminolevulinato desidratase, ou porfobilinogênio sintase ou δ-amino-levulinato hidrolase; E.C.: 4.2.1.24
17β-E ₂ (ou E ₂)	– 17β-estradiol: C ₁₈ H ₂₄ O ₂
DA	– dopamina
DTNB	– ácido 5,5'-DiTiolbis(2-NitroBenzóico): [-SC ₆ H ₃ (NO ₂)CO ₂ H] ₂
EC ₅₀	– 50% of effective concentration
EC ₁₀	– 10% of effective concentration
ED ₅₀	– 50% of effective dose
ED ₁₀	– 10% of effective dose
EROD	– 7-ethoxyresorufin-O-deethylas
ESxH	– hormônios sexuais esteróides.
GR (ou GSSGr)	– glutationa redutase
GSH	– glutationa reduzida
GSSG	– glutationa oxidada
GSt	– glutationa S-transferase
GP (ou GSHp)	– glutationa peroxidase
GtRH	– hormônio liberador de gonadotropinas
GtH	– gonadotropina
6HB-E ₂	– hexa-hidrobenzoato de estradiol: BENZO-GINOESTRIL AP* SARSA®
LOEC	– low observed effective concentration
LOED	– low observed effective dose
MT	– metalotioneína
MTs	– isoformas da metalotioneína
P450	– complexo citocromo oxidase P450
PBG	– porfobilinogênio
PMSF	– ácido fenil-metil-sulfonil fluorídrico: C ₇ H ₇ FO ₂ S
SDS-PAGE	– sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	– superóxido dismutase
TMX	– citrato de tamoxifeno: C ₂₆ H ₂₉ NO.C ₆ H ₈ O ₇
VTG	– vitelogenina
WB	– Western Blot

RESUMO

Biomarcador é aqui considerado uma resposta fisiológica individual do organismo, como consequência (efeito) da exposição (causa) do animal a um agente exógeno, contaminante ou substância tóxica. Esta tese trata da padronização de metodologias que envolvem técnicas laboratoriais bioquímicas e de biologia molecular para o emprego de biomarcadores em *Hoplias malabaricus* (traíra), a saber: cinética enzimática e constatação de inibição da δ -aminolevulinato desidratase, esta associada ao monitoramento de parâmetros hematológicos; quantificação indireta dos teores teciduais (fígado e brânquias) de metalotioneína; e quantificação relativa da vitelogenina plasmática (*in vivo*) ou sintetizada *in vitro* por cultivo primário de hepatócitos, através da imunodeteção da proteína por anti-soro policlonal produzido em coelhos. Outrossim, no que concerne à expressão da vitelogenina, foi descrita a definição conceitual, bem como realizada a demonstração empírica de um modelo matemático (Índice Vitelogênico utilizado como biomarcador) para a quantificação de efeitos estrogênicos ou anti-estrogênicos em peixes. A traíra foi utilizada como modelo experimental para bioensaios, nos quais foram consideradas condições físico-químicas próximas a de ambientes tropicais, a exposição via alimento por longos períodos (subcrônica) e a busca de respostas detectáveis e consistentes, que permitam a utilização da espécie em futuros estudos de biomonitoramento ambiental. Ensaios *in vitro* permitiram estabelecer um teste de estrogenicidade empregando hepatócitos de traíra, e a quantificação dessa resposta, considerando diferentes mecanismos moleculares de citotoxicidade. Os resultados aqui obtidos e comparados com outros estudos em peixes revelam que a eficiência do uso de biomarcadores é dependente de estudos prévios (*in vivo* e *in vitro*) que considerem os vários processos celulares e fisiológicos como relacionados reciprocamente e integrantes de um sistema único, o organismo.

Palavras-chave: traíra; *Hoplias malabaricus*; biomarcadores; chumbo inorgânico; metilmercúrio; δ -aminolevulinato desidratase; metalotioneína; vitelogenina; teste de estrogenicidade *in vitro*; índice vitelogênico.

ABSTRACT

A biomarker is defined as a change in a biological response (ranging from molecular through cellular and physiological responses) which can be related to exposure to or toxic effects of environmental chemicals or any biological response to an environmental chemical at the subindividual level, indicating a deviation from the normal status that cannot be detected in the intact organism. This thesis concerns about methodology standardizing of biochemical and molecular procedures that allows the employment of biomarkers in *Hoplias malabaricus* (traíra), as follows: enzymatic kinetics and inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase; hematological measurements; indirect quantifying metallothioneins in liver and gill tissues; estrogenic priming, isolation and immunochemical detection (polyclonal antisera) of vitellogenin from plasma (bioassays), or from *in vitro* vitellogenin production by hepatocytes. This protein production has also been used in *in vitro* experiments, which showed the vitellogenic index as applicable screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. The use of those parameters as sensitive and long-term biomarkers for sublethal, subchronic, and trophic exposures to inorganic lead (II) or methylmercury was investigated in *Hoplias malabaricus*, as well as a sensitive biomarkers discussed here in relation to their feasibility in fish exposure to metals assessment. According to the current results, due to its high-level trophic position and wide geographical distribution in South America, we are suggesting the use of these biomarkers in biomonitoring programs of freshwater areas impacted by lead and mercury.

Keywords: traíra; *Hoplias malabaricus*; biomarkers; inorganic lead (II); methylmercury; δ -aminolevulinic acid dehydratase; metallothioneins; vitellogenin; cultured primary hepatocytes; vitellogenic index.

INTRODUÇÃO GERAL

1 O USO DE BIOMARCADORES EM PEIXES

Um biomarcador é uma resposta fisiológica individual ou um padrão morfológico alterado num organismo e, em ambos os casos, é a consequência (efeito) da exposição (causa) do organismo a um agente exógeno, este doravante denominado xenobiótico. Portanto os biomarcadores integram sistemas biológicos operacionais indicando processos de contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica. Ao representar um processo constitutivo do organismo, o biomarcador compreende uma resposta biológica que pode ser mensurada ou detectada por diversos métodos que empreendem o processo *per se* (como a expressão de uma proteína ou alguma atividade catalítica), ou que se utiliza de alguma estrutura do sistema biológico para se inferir alterações na organização do organismo, como por exemplo, uma alteração morfológica em nível tecidual, celular ou até molecular. Os métodos no campo da bioquímica e da biologia molecular são, portanto, os mais utilizados para o estabelecimento e uso de uma resposta biomarcadora (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Contudo análises de caráter subjetivo como alterações macroscópicas ou de variáveis discretas (p. ex.: presença ou ausência de um componente molecular) podem ser úteis caso haja alguma especificidade causa/efeito e se conheça o histórico da espécie em questão e de suas interações no meio ambiente.

Embora baseando-se em análises individuais, um biomarcador de grande utilidade indica a exposição subletal de um grupo de organismos que, por propriedades inerentes ao mesmo, põem em risco uma comunidade natural. Como exemplo a capacidade reprodutiva e de procura de alimento podem sofrer alterações que tornam inviável a continuidade de uma população de uma espécie biológica.

Em contrapartida ao monitoramento químico-analítico de ambientes impactados, processos biológicos alterados permitem um diagnóstico anacrônico dentro de um espaço geográfico considerado. O poder de predição que possa advir

de um sistema altamente complexo é superior ao de processos estritamente inanimados, pois aquele é menos sujeito a intervenientes ambientais, já que possui um mecanismo pré-determinado para a manutenção da ordem de nível molecular, celular, individual e, dependendo do biomarcador usado, populacional. Este último caso deve ser a ferramenta pretendida, que deve alocar interesse político e investimento financeiro para a pesquisa dirigida e para biomonitoramentos, desenvolvidos em condições do território nacional.

Em revisão sobre o tema, OOST, BEYER e VERMEULEN (2003), apresentam os biomarcadores subdivididos em:

- a) **biomarcador de exposição:** detecta e quantifica a presença do xenobiótico, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares em compartimentos do organismo; infere exposição prévia e fornece os índices de bioacumulação da biota, estes determinados por métodos bioquímicos e de química analítica;
- b) **biomarcador de efeito:** parâmetros bioquímicos ou fisiológicos mensuráveis que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual que permitam inferir efeito adverso, prejudicial ao operar normal do organismo saudável, efeito pré-clínico, subletal ou até letal;
- c) **biomarcador de susceptibilidade:** indica a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobiótico; elucida variações no grau de resposta diferencial entre organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária.

Os biomarcadores aqui tratados possuem características que *a priori* permitem inserí-los na classe da alínea (b), muito embora envolvam processos que podem estar relacionados com uma tolerância adquirida ou hereditária. Contudo há uma restrição para tal inferência, já que este trabalho baseia-se fundamentalmente em condições experimentais controladas.

A mesma revisão supracitada compila e discute a exeqüibilidade dos biomarcadores atualmente utilizados em peixes, para que possíveis predições e

medidas de saneamento possam sustentar os Estudos de Impacto Ambiental (EIAs) associados a alterações antrópicas cada vez mais freqüentes, intensas e danosas aos ecossistemas naturais e à integridade da biodiversidade do planeta.

Propõe-se aqui portanto a padronização de técnicas e procedimentos que possam ser úteis e que devem preceder o estabelecimento de respostas biológicas de organismos como indicativas do efeito adverso de metais xenobióticos.

Os ecossistemas aquáticos em geral constituem o receptáculo final de substâncias produzidas e despejadas no meio pela atividade antrópica e, ou por processos naturais. Um xenobiótico passa a integrar um organismo aquático quando este àquele está exposto, podendo ser absorvido e bioacumulado. Este é um conceito que, por extensão, pode ser aplicado a toda a biota, considerando-se o modelo de bioacumulação proposto por OOST, BEYER e VERMEULEN (2003), onde ocorrem:

- a) **bioconcentração:** acúmulo direto do xenobiótico a partir da água, pelas brânquias ou pela pele, que pode ser mensurado como o fator de bioconcentração, ou seja, a razão entre a concentração da substância no organismo pela concentração da mesma na água;
- b) **biomagnificação:** acúmulo por via trófica, a partir da alimentação, que pode ser mensurado como o fator de biomagnificação, ou seja, a razão no equilíbrio entre a taxa constante de acúmulo pela taxa constante de eliminação (por excreção ou metabolismo); ou ainda: “um incremento progressivo de concentrações, a partir da fonte de exposição e através dos níveis tróficos de organismos vivos”, em ascendência (PAIN, 1995).

O chumbo inorgânico divalente (Pb^{++}) e o metilmercúrio (H_3C-Hg^+) são as substâncias aqui investigadas como xenobióticos que causem efeitos subletais, para o estabelecimento de biomarcadores sensíveis à sua exposição. Não pretende-se aqui o estudo dos parâmetros farmacocinéticos, e relações como dose-resposta ou tempo-resposta para com essas substâncias. O foco central das três subdivisões principais desta tese (capítulos) é relacionado ao método, bem como às relações entre duas respostas obtidas por duas técnicas de observação

empírica. Assim, O Pb^{++} e o H_3C-Hg^+ são empregados para se obter a resposta pretendida, diferente da situação controle. Não obstante, não há como prescindir de inferências acerca da fisiologia do organismo, comprometido pelas exposições.

Muito embora o Pb^{++} tenha sido relatado como substância que não sofre biomagnificação, o falseamento da hipótese contrária é essencial para que se sustente esse ponto de vista, em relação a ecossistemas tropicais e subtropicais. Além disso dados obtidos *in loco* (ambientes contaminados) por si, isolados, são ineficazes para constatação de biomagnificação, já que a absorção do xenobiótico pode não se dar exclusivamente pela via trófica (PAIN, 1995). Segundo este autor, muitos organismos aquáticos, inclusive peixes, podem absorver e acumular altas concentrações de chumbo e em geral considera-se que este metal possui efeitos cumulativos em peixes (VIGHI, 1981).

Há um extenso conhecimento refletido em inúmeras publicações acerca da neurotoxicidade, da notória biomagnificação e de outros efeitos do H_3C-Hg^+ em organismos e ecossistemas. Contudo, no Brasil, a contaminação de ambientes aquáticos, principalmente na região Amazônica, sempre será de interesse público devido às persistentes atividades de mineração de ouro, que incrementam os teores considerados “normais” para o sedimento daquela região. Somado a isto, a transformação microbiana do Hg^{++} para o H_3C-Hg^+ (metilação) aumenta a toxicidade do metal em ambientes favoráveis, dispersando o metal do interior da bactéria para a coluna d’água.

Quanto ao conhecimento disponível no campo da toxicologia ambiental de metais pesados, considera-se que a investigação com espécies animais brasileiras deva ser realizada o quanto antes, para que se possa desenvolver métodos para constatar os níveis de susceptibilidade e toxicidade a esses metais. Biomarcadores que possam prever consequências da contaminação ambiental (antes desta tornar-se um problema irreversível ou muito caro para ser sanado) se disponíveis, podem auxiliar na prevenção das condições que colocam em risco a integridade de ecossistemas e de espécies biológicas.

O uso de dados importados de países do hemisfério norte e relativos a estudos com peixes constitui os argumentos essenciais nos quais se baseiam a

Legislação Ambiental brasileira, porém tal uso pode estar introduzindo um grave erro na determinação dos limites máximos permissíveis de metais pesados em ecossistemas aquáticos brasileiros. Há portanto a necessidade urgente de se gerar dados que possam auxiliar uma melhor discussão, relativa àqueles limites.

2 *HOPLIAS MALABARICUS* COMO MODELO EXPERIMENTAL

A pesquisa dirigida faz-se fundamental à preservação dos ecossistemas, já que sistemas biológicos e bioquímicos somente podem ser interpretados à luz da ordenação conceitual e sistemática dos fenômenos observados e possíveis. Em países economicamente desenvolvidos, o uso de moléculas ou reações químicas em organismos é amplamente estudado com o objetivo de se estabelecer indicadores da presença de poluentes ambientais e seus efeitos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). No Brasil os casos de contaminação ambiental ainda não são biomonitorados adequadamente, pois não existem dados pretéritos que estabeleçam um histórico de diagnóstico na maioria dos ecossistemas brasileiros. Precede portanto a obtenção de tais dados objetivando um diagnóstico evolutivo das alterações nestes ambientes.

A traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae; constitui uma espécie com ampla distribuição geográfica em Neotropica, abrangendo quase todas as bacias desde a América Central até o rio Colorado (Argentina) e apresentando diferentes áreas de endemismo; habita preferencialmente ambientes lênticos e apresenta comportamento territorialista. Esta espécie é onívora durante o primeiro ano de desenvolvimento, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos. Após este período (normalmente após alcançarem 12 cm de comprimento) tornam-se estritamente carnívoras, altamente especializadas à piscivoria. *Astyanax* sp (lambaris) são seus itens alimentares preferenciais, porém em situações de pouca abundância de presas, enriquecem a sua dieta com outros itens, como crustáceos por exemplo. Estas presas alternativas tanto podem ser animais que habitam a coluna de água, quanto animais bentônicos. Essas informações sobre a biologia da traíra foram obtidas em LOPEZ e FENOCCHIO (1994), LOUREIRO (1995) e LOWE-McCONNELL (1999).

O comprimento padrão do menor espécime de *Hoplias malabaricus* capturado em período de reprodução no reservatório de Segredo (PR) foi de 17 cm para fêmeas (n = 219) e 21,2 cm para machos (n = 169) observados por SUZUKI e

AGOSTINHO (1997) numa variação de 3,1 a 50 cm ($n = 1815$). Segundo os autores várias espécies de peixes tropicais atingem a maturidade com 40% a 50% do comprimento assintótico.

A boa aceitação no mercado pode representar riscos potenciais à saúde humana, em casos de contaminação pela cadeia trófica (biomagnificação) o que está também associado à ampla distribuição geográfica de *Hoplias malabaricus*. Além disso, em relação a espécies de peixes tropicais e subtropicais, considera-se que ainda há uma escassez de estudos que objetivem a padronização de metodologias para o uso de biomarcadores.

Respostas individuais obtidas em laboratório raramente permitem que, por extensão, se possa aplicá-las na interpretação de fenômenos naturais, em nível populacional. Este é o maior desafio de pesquisadores contemporâneos, que se utilizam de biomarcadores. O emprego de *Hoplias malabaricus* como modelo experimental tem se mostrado um progresso em relação a esse desafio, pois envolve aspectos da biologia da espécie que estão relacionados com a resposta obtida e que raramente são considerados, na maioria dos estudos com biomarcadores em peixes. Tais aspectos são as condições físico-químicas próximas a de ambientes tropicais, a exposição via alimento por longos períodos (subcrônica) e a busca das menores quantidades de um xenobiótico, que possam revelar uma resposta detectável consistente, sem matar o animal (subletal). Assim os bioensaios e ensaios *in vitro* ainda são os estudos prévios necessários para o uso de biomarcadores em biomonitoramentos e para a determinação de espécies bioindicadoras que permitam predições consistentes.

A espécie *Hoplias malabaricus* mostrou-se como um excelente modelo biológico experimental para estudos dos efeitos de xenobióticos administrados através da via trófica: em exposição subcrônica de traíras ao chumbo ($21 \mu\text{g Pb}^{++}.\text{g}^{-1}.\text{120 h}^{-1}$) não se observou mortalidade e a espécie adaptou-se bem às condições laboratoriais e à manipulação durante o experimento (ALVES COSTA, 2001). Além disso, *Hoplias malabaricus* já foi utilizada em outras experimentações tróficas semelhantes e com igual sucesso, servindo para o estudo de outros xenobióticos ou biomarcadores de contaminação aquática, como

relatado por LEMOS (2000), CESTARI et al. (2004), RABITTO et al. (2005), ALVES COSTA et al. (2006), OLIVEIRA RIBEIRO et al. (2006) e MELA et al. (submetido).

3 INTERAÇÕES ENTRE BIOMARCADORES

Alguns dos biomarcadores freqüentemente utilizados em peixes e outros organismos foram compilados na figura 1, assim como as interações entre eles.

A eficiência do uso isolado de apenas um biomarcador deve ser dependente da alta especificidade da resposta ao xenobiótico, ou de estudos prévios que considerem, para a espécie em questão, os vários processos bioquímicos, celulares e fisiológicos como relacionados reciprocamente e integrantes de um sistema único, o organismo.

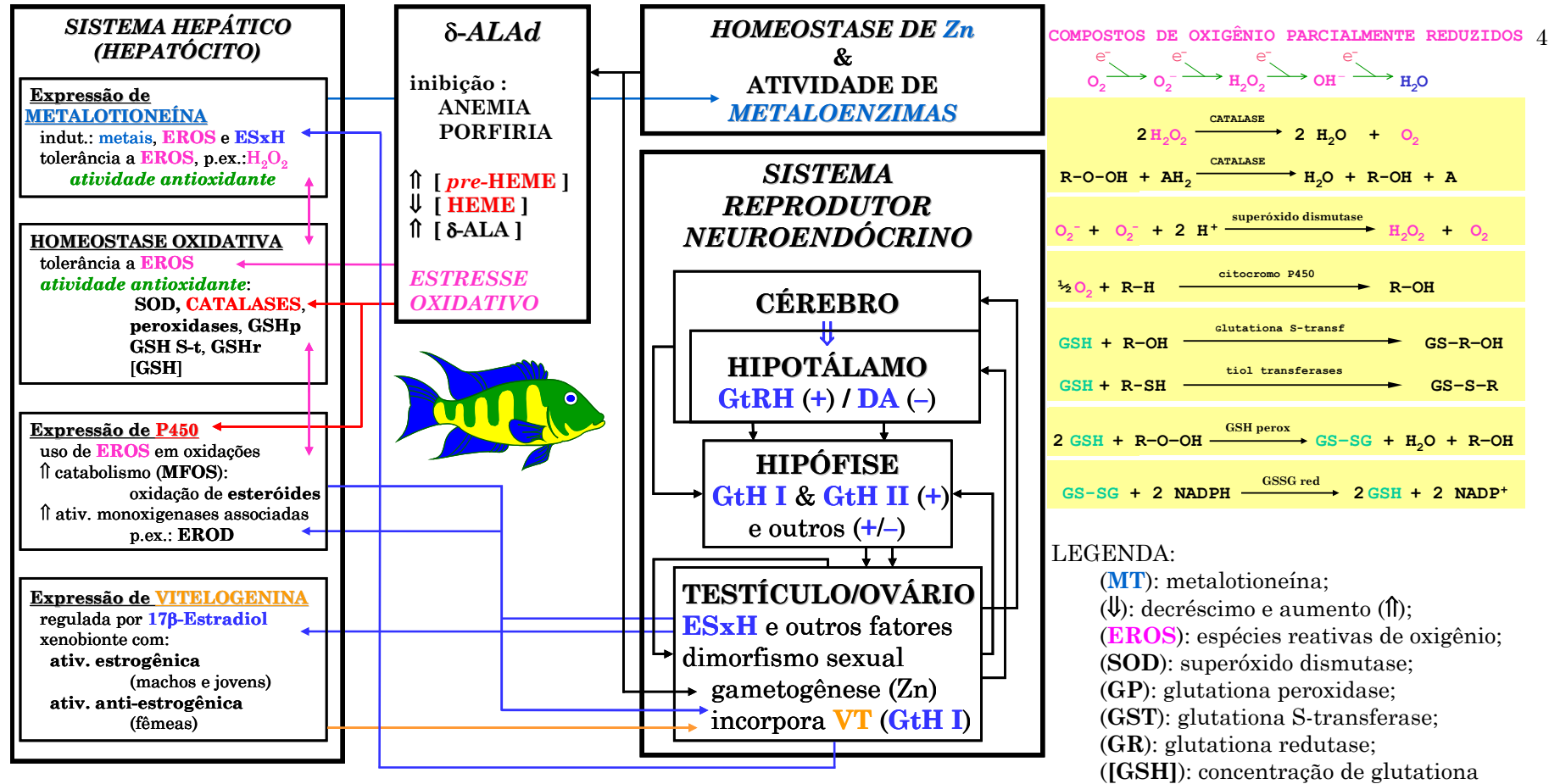
A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALAd), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou δ -aminolevulinato hidrolase (E.C.: 4.2.1.24), exerce um papel crucial na vida biológica da célula eucariótica, por fazer parte da rota de síntese do grupo HEME. Este é o grupo prostético da metaloenzima hemoglobina, que faz o transporte de oxigênio no sangue, mas em primeira instância também é requerido na cadeia de transferência de elétrons da célula (“respiração” celular). O HEME está envolvido com a atração de elétrons pelas cargas positivas do metal ferro, átomo que muda do estado férrico (Fe^{+3}) para o estado ferroso (Fe^{+2}), quando esse recebe um elétron. Proteínas que têm o grupo HEME em sua estrutura (hemoproteínas) operam de diversas formas na célula eucariótica: catalases, complexo citocromo oxidase P450 e outros citocromos.

A δ -ALAd pode ser encontrada na maioria das bactérias aeróbicas e em plantas e animais. A atividade catalítica da δ -ALAd permite a transformação química de duas moléculas de δ -aminolevulinato (δ -ALA) em um dos quatro anéis pirrólicos constituintes do grupo HEME, o porfobilinogênio (PBG); neste processo ocorre uma condensação aldólica e uma ciclização, com eliminação de duas moléculas de água (fig. 2).

Por ser uma enzima sulfidrílica, a δ -ALAd tem seus grupos tiólicos (no sítio ativo) em estado reduzido ($-\text{SH}$), e estes são imprescindíveis para a plena atividade enzimática. O sítio ativo é composto por 2 resíduos de cisteína, um átomo de zinco, 1 ou 2 resíduos de histidina e de lisina e resíduos de aminoácido

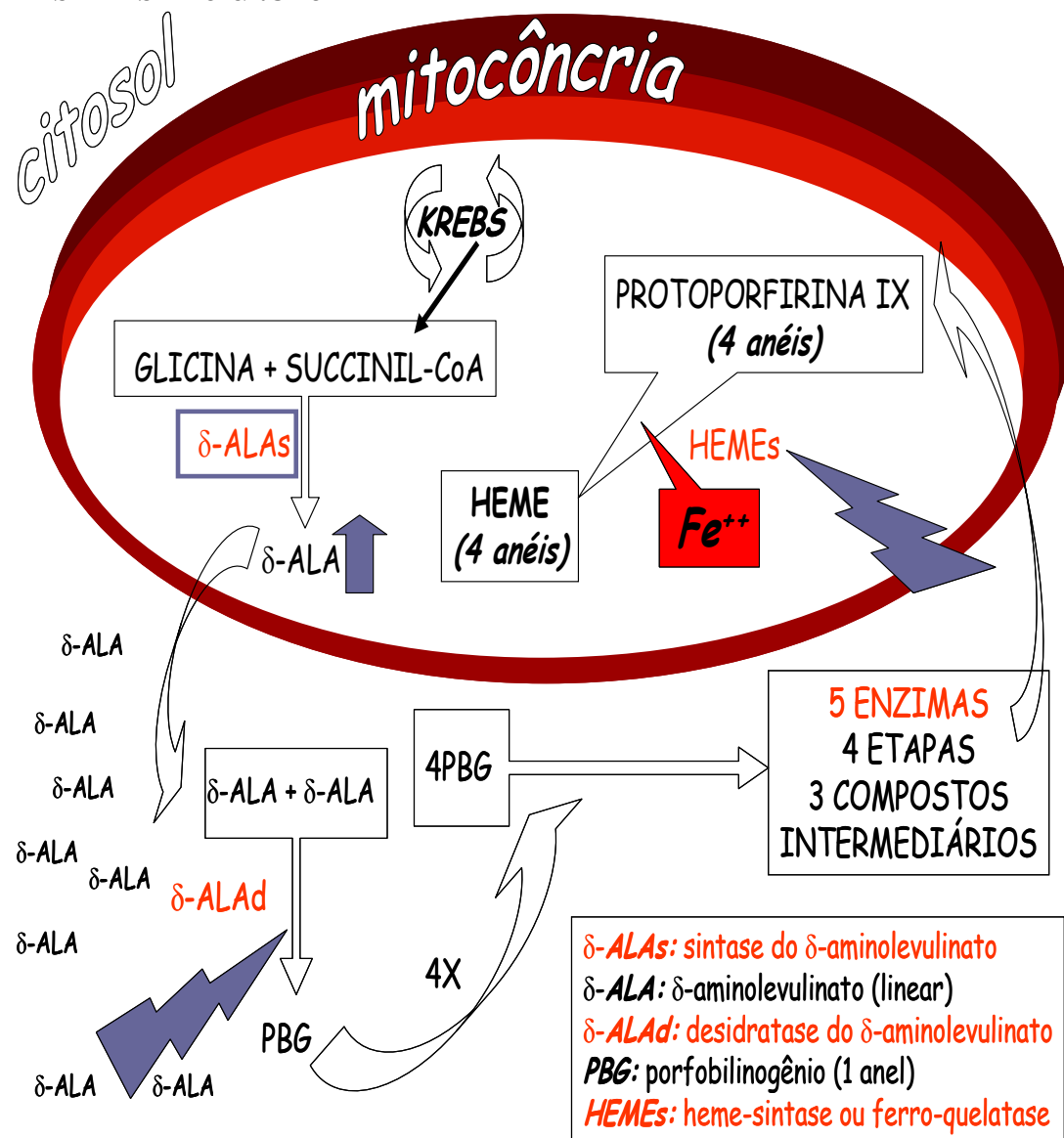
hidrofóbicos; fora do sítio ativo há 9 resíduos de tirosina, 4 de triptofano e 6 de metionina: relatado por GIBSON (1955), RODRIGUES (1987) e BAINY (1990).

FIGURA 1 – INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE ALGUMAS RESPOSTAS BIOMARCADORAS UTILIZADAS EM PEIXES



reduzida; **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**; (**P450**): complexo citocromo oxidase P450 (possui grupo **HEME** integrante); (**MMFOS**): *microsomal mixed function oxidase system*; (**ativ.**): atividade; (**EROD**): 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; (**VT**): vitelogenina; (**E₂**): estradiol; (**Zn**): zinco; (**δ -ALAd**): δ -aminolevulinato desidratase; ([**δ -ALA**]): concentração de δ -aminolevulinato; ([**HEME**]): concentração de **HEME**; [(+) e (-)]: *feedback*; (**GtRH**): hormônio liberador de gonadotropinas; (**DA**): dopamina; (**GtH**): gonadotropina; (**ESxH**): hormônios sexuais esteróides.

FIGURA 2 - ROTA DE SÍNTESE DO GRUPO HEME



A presença do metais divalentes no sítio ativo da δ -ALAd e a interação entre o metal e seus grupos $-SH$ inibem a sua atividade enzimática. Segundo HODSON, BLUNT e WHITTLE (1984) a δ -ALAd seria sensível a vários metais *in vitro*, mas somente ao chumbo *in vivo*.

Quando há inibição da atividade da δ -ALAd por metais divalentes, seu substrato, o δ -aminolevulinato (δ -ALA) e outros precursores do grupo HEME aumentam em concentração na célula (porfiria) podendo levar o organismo a um quadro clínico sistêmico de anemia (baixa concentração de hemoglobina funcional).

Esse quadro (anemia) é intensificado pela inibição causada pelo chumbo na ação da ferroquelatase (incorporação de ferro no centro de protoporfirina IX (fig. 2), conquanto que um decréscimo em concentração de HEME na mitocôndria, aumente a síntese de δ -ALA, que em excesso exerce retro-alimentação negativa sobre a δ -ALA sintase.

Outrossim, o substrato δ -ALA está envolvido com a oxidação da oxi-hemoglobina, o que produz compostos de oxigênio parcialmente reduzidos com efeitos tóxicos à célula, podendo levá-la a uma resposta defensiva que se revela com o aumento da atividade eritrocitária da superóxido dismutase (SOD) e da glutational peroxidase (GSHp). Essa relação entre o acúmulo de precursores do grupo HEME, a produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento da atividade antioxidante foi observada por MONTEIRO et al. (1985) em trabalhadores expostos ao chumbo numa fábrica em Diadema (SP).

Portanto alterações na atividade δ -ALAd é uma resposta relacionada com os biomarcadores que indicam estresse oxidativo e, por conseguinte, com outros relacionados a esse tipo de estresse, como biomarcadores histopatológicos (RABITTO et al., 2005) ou que indiquem danos (“quebras”) em macromoléculas como a DNA (CESTARI et al., 2004). Recentemente a atividade da δ -ALAd tem sido usada como biomarcador de efeito, relacionado ao estresse oxidativo de mamíferos (PEROTTONI et al., 2004a, 2004b), após exposição ocupacional de trabalhadores ao chumbo (GURER-ORHAN, SABÝR e ÖZGÜNES, 2004), ou em peixes (CAMPANA; SARASQUETE; BLASCO, 2003).

A atividade da δ -ALAd aferida em tecidos hematopoiéticos é um indicador do processo de formação do sangue, servindo para se avaliar diferentes taxas de eritropoiese em indivíduos. Quando essa avaliação vem acompanhada de outros parâmetros hematológicos como a concentração de hemoglobina no sangue total, o hematócrito percentual e a contagem de eritrócitos (ou eritroblastos), tem-se um panorama mais completo do processo renovação das células do sangue. Já a atividade da δ -ALAd eritrocitária aferida a partir do sangue reflete uma condição pretérita de hematopoiese, pois a enzima não tem atividade acoplada estruturalmente ao processo de formação do sangue, ou seja, não há papel fisiológico da δ -ALAd em eritrócitos maduros. Contudo a δ -ALAd eritrocitária pode ligar-se a metais divalentes como o chumbo (BERGDAHL et al., 1998), indicando exposição recente e constituindo-se de uma resposta biomarcadora.

De acordo com RODRIGUES (1987) e BAINY (1990), o zinco compõe estruturalmente a δ -ALAd funcional, em interações que estabilizam a estrutura da proteína (possibilitando sua conformação requerida à catálise) e mantêm os grupos tiólicos no estado reduzido (proteção contra a inativação pelo oxigênio). Embora o zinco e a apo- δ -ALAd sejam elementos coletivamente suficientes para a catálise, o zinco não é isoladamente necessário, permitindo por ausência que a apoenzima tenha atividade em condições anaeróbicas. Isso quer dizer que da ocorrência dos elementos causais (presença do zinco e da apo- δ -ALAd) pode-se deduzir o efeito (catálise) mas sendo a inferência recíproca impossível.

Como revisado por VALLEE (1991), VASAK e HASLER (2000), o zinco é componente integral de aproximadamente 300 enzimas encontradas em distintas espécies e filos e de aproximadamente 200 proteínas que atuam como fatores de transcrição (ligantes de DNA como os fatores *zinc fingers*); o metal ainda atua estabilizando a estrutura de proteínas e ácidos nucleicos, preservando a integridade de organelas subcelulares e participando em processos de transporte celular, e em respostas do sistema imunológico.

Durante a maturidade sexual o zinco é responsável pela diferenciação dos oócitos na maturação do ovário de peixes (KIME, 1999). Seu acúmulo em células hepáticas neste período vem precedido de um acréscimo em teores hepáticos de

metalotioneína (polipeptídeo descrito abaixo). A vitelogenina (proteína descrita no final desta introdução) é um dos componentes plasmáticos que transporta o zinco do fígado aos ovários (THOMPSON et al., 2003).

A homeostase dependente do zinco, a sua disponibilidade para processos celulares, bem como seu acúmulo, estocagem, distribuição e liberação em tecidos é diretamente dependente da expressão celular de metalotioneínas (VASAK e HASLER, 2000).

A metalotioneína (MT) é uma estrutura protéica da célula, considerada um forte quelante de metais: 7 átomos-grama de metal *per* mol de MT. A expressão de MT é induzida pela exposição a metais, aumentando a tolerância fisiológica de organismos a eles, segundo VALLEE (1991), KIME (1999) e ANDREWS (2000). Vertebrados contêm duas ou mais isoformas de MT (família de proteínas doravante denominada no plural – MTs): MT-1 a MT-4 em mamíferos (VASAK e HASLER, 2000).

Assim alterações na produção constitutiva das MTs estão relacionadas com a distribuição e estocagem de zinco pelas células, o que pode influir na atividade de enzimas como a δ -ALAd, alterando indiretamente as condições oxidativas normais. Há também uma relação direta, quando a expressão das MTs é induzida por agentes oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (VASAK e HASLER, 2000).

Culturas de células gonadais de truta induzidas à produção de MTs (por zinco ou cádmio) apresentam acréscimo na tolerância ao H_2O_2 , o qual também é capaz de induzir a expressão de MTs (KLING e OLSSON, 2000). Também há outros relatos de espécies reativas de oxigênio relacionadas com a indução da MTs, ver KÄGI (1991), VASAK e HASLER (2000) em revisão, AHMAD et al. (2000) em bagres e KONDOH et al. (2001) para estresse oxidativo mitocondrial de camundongos. De outra forma, SUNTRES e LUI (2006) demonstram que células tumorais com altos teores de MTs induzida por cobre são mais susceptíveis ao estresse oxidativo.

Além disso, a expressão das MTs sofre controle hormonal, incluindo a indução por hormônios sexuais esteróides (VALLEE, 1991). KIME (1999) revisa

que poluentes que são desreguladores neuro-endócrinos podem promover alterações na produção de MTs de peixes, efeito que está normalmente associado a variações sazonais, estas como intervenientes na regulação hormonal. Além disso a produção induzida de MTs no fígado também está relacionada ao sistema reprodutor: disfunções na homeostase de zinco podem alterar o desenvolvimento (diferenciação) e a maturação de gametas.

A utilização de respostas biomarcadoras relacionadas às alterações dos teores teciduais de MTs, ou de sua expressão (indução ou supressão), deve portanto considerar a ampla rede de interações entre componentes moleculares, que pode influenciar na resposta obtida (ver fig. 1).

Existem outros compostos citosólicos que estão envolvidos com ações similares a da MT, ligando-se a metais pesados e reduzindo suas interações com outros componentes celulares. Moléculas tiólicas como a cisteína livre ou a glutathiona (GSH) devem ser consideradas no papel que a MT exerce ao aumentar a tolerância fisiológica de organismos aos metais pesados (VASAK e HASLER, 2000). A GSH, por sua reatividade contra eletrófilos, está relacionada com a excreção de metais pesados pela bile de mamíferos, mas isso não pode ser generalizado para peixes, segundo HEATH (1995).

A glutathiona reduzida (GSH) é um composto tripeptídico (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que perfaz a maior parte dos grupos tiólicos livres da maioria das células vivas e, segundo AKERBOOM e SIES (1991), PLUMMER et al. (1991) e MANAHAM (2000), participa: da desintoxicação de xenobióticos orgânicos (reações de conjugação: biotransformação de FASE II); da remoção de peróxidos pela glutathiona peroxidase; da proteção contra radiação ionizante e contra eletrófilos (cátions metálicos, por exemplo); da modulação de atividades enzimáticas dependentes do equilíbrio *redox* e da manutenção da condição reduzida dos grupos -SH de proteínas citosólicas.

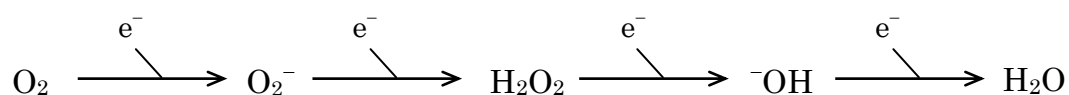
A GSH atua, portanto como um tampão oxidativo, mantendo o citosol na condição reduzida essencial para a célula. A oxidação da GSH produz o dissulfeto de glutathiona (GSSG), essa forma oxidada é produzida sob a ação enzimática da glutathiona peroxidase (GSHp) ou mesmo em reações não catalisadas. A glutathiona

S-transferase (GSt) representa uma família de enzimas homólogas envolvidas com as reações de FASE II no fígado: conjugação da GSH com o xenobiótico ou com o metabólito produzido na FASE I, gerando compostos (GS-R) mais facilmente eliminados pela bile. Pela ação de tioltransferases como a GSt, a GSH pode também originar compostos dissulfidrídicos (GS-S-R). A glutathiona redutase (GSSGr) ligada a um sistema de carreadores de elétrons (NADPH/NADP⁺) mantém os níveis normais de GSH na célula. A GSHp, a GSt, e a GSSGr atuam juntas para o equilíbrio *redox* do sistema GSH/GSSG. Para detalhes ver AKERBOOM e SIES (1991), PLUMMER et al. (1991), DAGGETT et al. (1998), MANAHAM (2000) e WRIGHT et al. (2000).

A concentração de GSH não é necessariamente a mesma em diferentes populações de células e provavelmente existam *pools* subcelulares de GSH. Contudo decréscimos significativos (menos que 30% dos valores normais) principalmente no fígado, são indicadores de um metabolismo alterado por xenobióticos e de um acréscimo em toxicidade causada por metabólitos eletrofílicos (PLUMMER et al., 1991).

Usualmente a maior parte do oxigênio intracelular dissolvido é consumida na fosforilação oxidativa, pois a molécula é o último acceptor de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. O excedente participa de uma série de eventos celulares: ao menos 200 enzimas usam o oxigênio em reações. O oxigênio e suas formas parcialmente reduzidas (fig. 3) surgem constantemente nas células e são altamente tóxicos devido a sua alta reatividade (MATHEWS e HOLDE, 1990).

FIGURA 3 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (PARCIALMENTE REDUZIDAS)



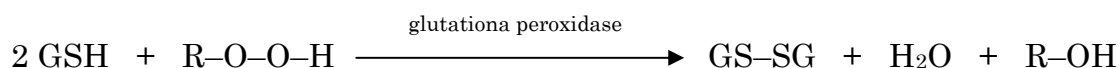
Esses compostos intermediários podem promover oxidações de macromoléculas celulares. Caso um destes componentes seja o DNA, o risco de mutagenicidade é iminente.

Os níveis metabólicos normais de espécies reativas de oxigênio são mantidos pela atividade antioxidante de diversas enzimas ou componentes

celulares, dentre eles: catalases, SOD, GSHp, GSSGr, GSt, GSH, MT (vide fig. 1 para nomenclatura). A atividade alterada dessas enzimas e os teores fisiológicos anormais de compostos como a glutathiona (GSH) e a metalotioneína (MT) podem ser usados como marcadores correlacionados para situações de estresse oxidativo, como descrito por MONTEIRO et al. (1985), DIMITROVA, TISHINOVA e VELCHEVA (1994), PETRIVALSKY et al. (1997), DAGGETT et al. (1998), KLING e OLSSON (2000), OLIVER, JIANG e CHERIAN (2006), CHEN et al. (2006).

A GSH atua como fator antioxidante pois, sob a ação da glutathiona peroxidase (fig.4), serve como substrato à remoção de peróxidos, tóxicos à célula.

FIGURA 4 - AÇÃO CATALÍTICA DA GLUTATHIONA PEROXIDASE



Assim um decréscimo nos níveis teciduais de GSH pode ser um indicativo de estresse oxidativo. As MTs também possuem ação antioxidante: MT a 13 μM é tão efetiva quanto a GSH a 10 μM na proteção do DNA contra o radical $\cdot\text{OH}$ no timo de ratos. Os possíveis mecanismos para tal proteção envolvem: as propriedades da proteína (reativa contra eletrófilos); a mediação da MT na redução de radicais livres, (doação de hidrogênio); a participação da MT em mecanismos de proteção do DNA e regulação da expressão gênica; e sua relação com a disponibilidade de zinco, um cofator em vários processos celulares (TEMPLETON e CHERIAN, 1991).

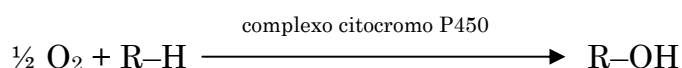
Como revisado por HEATH (1995), exposições crônicas de espécies de peixes marinhas ao cádmio, chumbo e mercúrio causam acréscimo nas concentrações hepáticas de GSH. Por outro lado o cádmio já foi observado causando o efeito contrário em *Anabas testudineus*, quando em exposição aguda a altas concentrações na água e isso foi acompanhado por um acréscimo na atividade da GSt. Como resposta a exposição *in vitro* de células de carpa a compostos oxidantes, obteve-se um decréscimo em sua toxicidade, relacionado ao aumento da quantidade de GSH e à atividade do sistema *redox* GSH dependente, isso após a pré-indução da MT por cádmio (WRIGHT et al., 2000).

Em trutas expostas ao zinco por via hídrica, houve acréscimo nos teores de GSH hepática, mas não na quantidade de RNA_m da MT. A situação foi inversa para a exposição ao cádmio, e a mistura dos dois metais incrementou os teores de GSH e a expressão de MT no fígado. (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2002).

O complexo citocromo oxidase P450 é uma unidade composta por estruturas protéicas predominantemente integrante da membrana do retículo endoplasmático (RE) de células eucarióticas (principalmente hepatócitos) e pode ser obtido na fração microssomal, após ultracentrifugação. Sua estrutura assemelha-se a do complexo citocromo α - α_3 oxidase (heterodímero transmembrana) e possui o grupo HEME modificado (reduzido). Quando complexado ao CO, absorve fortemente a luz com $\gamma = 450$ nm, daí sua denominação (MATHEWS e HOLDE, 1990).

A atividade do P450 é acoplada a uma cadeia de transporte de elétrons e à atividade de uma série de enzimas acessórias que dispõem do O₂ ou do CO, inserindo um átomo de oxigênio ao substrato que sofre hidroxilação (aumento da polaridade; fig. 5) e reduz um segundo átomo de oxigênio à água. Assim uma variedade de compostos lipossolúveis tornam-se mais hidrofílicos na célula, o que ajuda na excreção e eliminação pela bile, brânquias ou rins (HEATH, 1995).

FIGURA 5 – AÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO CITOCROMO P450



Em reações dependentes das coenzimas NADH e NADPH, o complexo citocromo oxidase P450 pode transformar ácidos graxos, esteróides, barbitúricos, benzo[a]pireno e outras drogas ou xenobióticos. A expressão do complexo citocromo oxidase P450 é regulável pela presença de seus substratos, no fígado e outros tecidos, e grande parte dos poluentes orgânicos podem servir como indutores, segundo MATHEWS e HOLDE (1990), HEATH (1995) e MELANCON (1995). Desta forma o complexo citocromo oxidase P450 tem importante participação nas reações de biotransformação de FASE I no fígado, responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos lipossolúveis (MANAHAN, 2000). Contudo o acréscimo em polaridade pode aumentar a toxicidade do xenobiótico, convertendo-

o numa forma mais tóxica.

Associadas com a indução do complexo citocromo oxidase P450 estão as atividades de um amplo espectro de enzimas denominadas monoxigenases: *mixed function oxidase system* (sistema MFO). Essas atividades são freqüentemente utilizadas como biomarcadores indiretos para a indução do complexo citocromo oxidase P450 por xenobióticos. Tais métodos, devido a sua sensibilidade, permitem a distinção mais acurada entre a expressão constitutiva e a induzida do ccP450, já que em condições ambientais realísticas o xenobiótico (agente indutor) usualmente ocorre em concentrações tão baixas que não incrementam significativamente a quantidade total de complexo citocromo oxidase P450 (MELANCON, 1995). Em peixes, a monoxigenase associada ao complexo citocromo oxidase P450 cuja atividade é mais utilizada como biomarcador é a 7-*ethoxyresorufin-O-deethylase* (EROD), como por STIEN et al. (1997), isso por ter baixa ou indetectável atividade em animais não contaminados.

Alguns compostos orgânicos são metabolizados no fígado (FASE I) tornando-se eletrófilos e portanto capazes de causar um decréscimo nos níveis de GSH *in vivo*. Indutores do sistema MFO podem contribuir nesse efeito e gerar hepato-toxicidade, caso o excesso de eletrófilos permaneça após os níveis de GSH terem sido significativamente reduzidos (PLUMMER et al., 1991).

Alterações na atividade da EROD hepática ou no sistema MFO podem estar envolvidas não somente com a exposição a xenobióticos orgânicos, mas também com disfunções no sistema reprodutor neuro-endócrino, estas causadas por outra classe de contaminantes. O catabolismo dos hormônios sexuais esteróides é dependente da atividade das monoxigenases do sistema MFO e modulação recíproca é constatada, ou seja, indução do sistema MFO por substâncias com ação hormonal (KIME, 1999).

Estudos de estrogenicidade *in vitro* com hepatócitos de truta demonstram redução na atividade e na expressão do ccP450, correlacionada com o aumento da concentração de estradiol e com o tempo de exposição das células. Há inibição da atividade da EROD após 72 horas e decréscimo na quantidade de RNA_m do

citocromo 1A após 48 horas de exposição ao estradiol a 1 μ M (NAVAS e SEGNER 2001).

A vitelogenina (VTG) é uma glico-fosfo-lipoproteína de alta massa molecular (de 170 a 200 kDa, dependendo da espécie) sintetizada em hepatócitos sob controle multi-hormonal: a transcrição de seu RNA_m é ativada por estrógenos, principalmente o 17 β -estradiol (E₂) após ligação com o receptor nuclear (RE). A VTG é o principal constituinte do vitelo de vertebrados ovíparos, sendo liberada no sangue (após exocitose nos hepatócitos) e incorporada pelo oócito sob controle da gonadotropina I (em peixes).

A expressão hepática da VTG ou a supressão da mesma por fatores exógenos (xenobióticos ou xenoestrógenos) têm sido usadas em peixes como indicadores de efeitos (anti)estrogênicos, ou seja, estrogênicos em machos e jovens, ou anti-estrogênicos em fêmeas, respectivamente, como revisado por KIME (1999) e OOST, BEYER e VERMEULEN (2003).

REIS-HENRIQUES et al. (1997, 2000) encontraram evidências, *in vitro* e *in vivo*, de que a concentração de VTG no oócito de *Oncorhynchus mykiss* regula a produção da própria VTG no fígado, por modular a produção de E₂ pelo ovário.

O sistema reprodutor neuro-endócrino de peixes pode ser definido por uma complexa organização realizada por estruturas diversas, das quais os neuro-hormônios, neurotransmissores, hormônios clássicos (peptídicos ou esteróides) e seus receptores têm crucial importância na sinalização intercelular, seja ela parácrina, sináptica, endócrina ou autócrina. Um esquema simplificado dessa organização referida consta na figura 1. De forma geral, assume-se que esse sistema em peixes é mais susceptível a fatores exógenos (físicos e químicos) que em mamíferos. KIME (1999) ressalta a importância de se determinar qual processo da intrincada rede de interações do sistema reprodutor de peixes é mais susceptível a um contaminante ambiental específico.

O alumínio causa um decréscimo na síntese de VTG (quantidade de proteína e de RNA_m) em culturas primárias de hepatócitos de *Oncorhynchus mykiss* induzidas por E₂: a inibição mostrou-se dependente da concentração de alumínio e não houve efeito de proteção pelo cálcio, mas houve restauração dos

níveis de VTG, 7 dias depois o metal ter sido suprimido do meio de cultivo por MUGIYA e TANAHASHI (1998) e HWANG, NAGAWA e MUGIYA (2000). Resultados semelhantes foram obtidos pelo mesmo laboratório em relação ao cádmio, contudo a resposta não foi dependente das concentrações usadas (regressão linear não significativa) e não houve restauração da síntese após a supressão do metal.

Em revisão, HEATH (1995) relata que o cádmio também está envolvido com altos níveis de hormônios sexuais esteróides em machos de truta expostos cronicamente, isso por inibir a atividade do ccP450, a eliminação normal pelo fígado e por estimular diretamente a síntese hormonal. O mercúrio (inorgânico ou metilado) causa lesões histopatológicas nas células de Leydig (responsáveis pela síntese de andrógenos) em *Clarias* sp expostos cronicamente. Isso veio acompanhado pelo decréscimo dos teores de colesterol plasmático, sugerindo um estímulo do catabolismo hepático ou uma inibição da síntese da molécula. O chumbo foi relatado como supressor da liberação de gonadotropinas em peixes, provavelmente por alterar os níveis de dopamina no hipotálamo, o que inibe a espermatogênese e a produção de andrógenos, bem como reduz o crescimento gonadal e os níveis de estradiol em fêmeas.

CAPÍTULO I

BIOMARCADORES NO SANGUE DE TRAÍRA (*HOPLIAS MALABARICUS*)

COLABORAÇÃO :

Francisco Filipak Neto, M.Sc.

Maritana Mela, M.Sc.

Profª. Drª. Helena Cristina da Silva de Assis

Publicações Relacionadas:

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P. H.; RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin. *Environmental Research* (no prelo). 2006.

ALVES COSTA, J. R. M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological aspects of dietary lead (II) and methylmercury exposure in *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (no prelo). 2006.

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 INIBIÇÃO DA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

A δ -ALAd (E.C.: 4.2.1.24) é um componente citosólico da célula eucariótica e que requer indiretamente o metal zinco para sua atividade normal (vide 3, figs.1 e 2).

A δ -ALAd é uma enzima não funcional em eritrócitos de mamíferos, já que a formação da hemoglobina (HB) está completa antes da circulação de células vermelhas no sangue. Por consequência a inibição da atividade catalítica pode ocorrer não acompanhada do quadro clínico sistêmico (anemia), do decréscimo em produção de HEME nas mitocôndrias e do acúmulo de seus precursores (porfiria) nas células e tecidos (HODSON; BLUNT; WHITTLE, 1984). Em peixes a δ -ALAd eritrocitária também é remanescente da síntese de HB que ocorreu em células hematopoiéticas, e embora os eritrócitos de peixes possuam núcleo (HEATH, 1995), esta organela é aparentemente inativa e a síntese de HEME não pode ocorrer devido à ausência de mitocôndrias (ALVES COSTA, 2001), encontradas somente nos estágios prematuros dos eritroblastos.

Com o decréscimo da atividade enzimática o substrato (δ -ALA) aumenta em concentração, podendo ser excretado pela urina e nela detectado e quantificado (técnica difícil para peixes); em peixes a enzima é um bom indicador de hematopoiese e a inibição induzida pode ser medida no fígado, rins, baço e sangue (HODSON; BLUNT; WHITTLE, 1984).

Alterações da capacidade catalítica da δ -ALAd eritrocitária têm sido estudadas por métodos que envolvem ensaios bioquímicos e quantificação por fotometria. Tal metodologia, aplicada a peixes por vários autores na década de 70, foi considerada como uma rápida, consistente, específica e sensível estimativa para concentrações de chumbo causando danos subletais (HODSON, 1976). Além disso o método serviria à identificação de fontes de dispersão do metal, por estimar “graus” de exposição de populações *in natura*. HODSON et al. (1977) evidenciam correlações lineares significativas entre o logaritmo de concentrações

de chumbo na água e no sangue e a atividade mensurável da enzima dos eritrócitos.

Desde então poucos trabalhos têm sido publicados, considerando estudos com a atividade desta enzima proveniente de tecidos de peixes. De fato apenas dez publicações foram encontradas disponíveis na rede internacional de computadores, em “<http://www.sciencedirect.com/>”, através do cruzamento de dados entre: “*aminolevulinic acid dehydratase*” e “*fish*”. O mais recente desses trabalhos (CAMPANA, SARASQUETE e BLASCO, 2003) apresenta na sua discussão uma relação de referências (tabela), nas quais o efeito do chumbo sobre a δ -ALAd de peixes foi reportado. Essa tabela está reproduzida no anexo 1. Dessa relação, o trabalho mais recente é de BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL (1998), que descrevem um método que permite a quantificação da atividade da δ -ALAd em pequenos peixes inteiros, dos quais é difícil a extração de tecidos.

A δ -ALAd já foi também utilizada em campo, juntamente com outros biomarcadores, em estudos de regiões contaminadas (bioensaios *in situ* com *Ictalurus punctatus*), por MARTIN e BLACK (1996, 1998).

Como fonte enzimática de δ -ALAd, AISEMBERG et al. (2005) utilizam invertebrados de água doce, num estudo acerca da sensibilidade da inibição aferida para se monitorar exposições de chumbo no ambiente.

Para OGUNSEITAN, YANG e ERICSON (2000) a atividade bacteriana da δ -ALAd serviu como biomarcador confiável para se inferir a biodisponibilidade do chumbo em ambientes contaminados.

No Brasil, a academia gaúcha (UFSM e UFRS) dá grande contribuição com o estudo da atividade da enzima em mamíferos (ratos e camundongos), a partir de vários tecidos como cérebro, rins, fígado e sangue (*in vivo* ou *in vitro*) e frente a vários tipos de xenobióticos, demonstrando a inibição por metais divalentes como Pb^{++} , Cd^{++} e Hg^{++} ou a restauração da atividade da δ -ALAd com drogas específicas (quelantes de metais ou sais de selênio ou zinco), assim como mensurando também parâmetros de estresse oxidativo que acompanham a porfiria: ROCHA et al. (1995); NOGUEIRA et al. (2003); FARINA et al. (2003); PEIXOTO et al. (2003); PEIXOTO, ROZA e PEREIRA (2004); PEROTTONI et al. (2004a, 2004b).

I.1.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Parâmetros hematológicos mensuráveis são considerados como indicadores pato-fisiológicos para o organismo como um todo (em nível sistêmico) e portanto são importantes em diagnósticos do *status* estrutural e funcional de peixes expostos a xenobióticos (ADHIKARI et al., 2004). Estudos hematológicos amiúde provêm procedimentos para o diagnóstico de doenças em mamíferos (RANZANI-PAIVA et al., 2000), e na aquicultura, para se avaliar interações entre diferentes níveis de nutrientes da dieta (LIM et al., 2000).

Embora as condições do sangue de peixes venham sendo cada vez mais utilizadas em programas de biomonitoramento como indicadores de alterações fisiológicas, segundo BOLS et al. (2001) e AFFONSO et al. (2002), o mais importante óbice para o uso desses dados em estudos ambientais é a falta de informação básica sobre a resposta do sangue contra agentes exógenos e principalmente em espécies tropicais.

A contagem de eritrócitos (RBC), a concentração de hemoglobina no sangue total ([HB]), o hematócrito percentual (Ht), o volume corpuscular médio (MCV), a quantidade de hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) são alguns dos parâmetros hematológicos comumente utilizados em peixes (HEATH, 1995), assim como o foram por CERQUEIRA e FERNANDES (2002), numa avaliação da exposição de *Prochilodus scrofa* ao CuSO_4 . Tais parâmetros, do sangue de *Hoplias malabaricus* foram utilizados por RIOS, KALININ E RANTIN (2002) e RIOS et al. (2005) num estudo das adaptações fisiológicas desenvolvidas pela traíra, quando sujeitas a longos períodos de jejum (até 240 dias).

Anemia é um quadro clínico sistêmico definido pelo decréscimo de [HB] funcional, seja por uma quantidade inadequada de [HB] nos eritrócitos ou por uma redução no número desses. O Pb^{++} , o Cd^{++} , o Hg^{++} foram relatados por causar anemia em peixes (HEATH, 1995). Embora mais tóxico que o Hg^{++} , o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ aparentemente tem um efeito mais brando sobre o sangue de peixes, como revisado por HEATH (1995) e em relação a anemia e valores de Ht de peixes.

Contudo o organometal pode se ligar de forma reversível com as sulfidrilas (–SH) da HB de eritrócitos de truta (MASSARO, 1974). O $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ é um xenobiótico altamente lipofílico que facilmente atravessa a “barreira” natural imposta pelo sangue (distribuição, diluição, imobilização, excreção, sistema porta-hepático) e sua via principal de exposição dá-se pela ingestão de alimentos contaminados (LIMKE; HEIDEMANN; ATCHISON, 2004).

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo é a padronização e constatação do uso da atividade da δ -ALAd eritrocitária e de um conjunto de parâmetros hematológicos como biomarcadores efetivos, para indicar as condições fisiológicas do sangue de *Hoplias malabaricus* frente a exposições subcrônicas por via trófica. Nesse caso o Pb^{++} foi utilizado pela sua conhecida ação inibitória sobre a atividade da δ -ALAd eritrocitária de peixes e o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, como substância teste. A δ -ALAd eritrocitária é portanto abordada como um indicador da continuidade da exposição a metais, e da biodisponibilidade destes, após longo período experimental, e o conjunto de parâmetros hematológicos, como indicadores das condições fisiológicas momentâneas do sangue.

I.2 MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1 BIOENSAIOS

Dezoito espécimes de *Hoplias malabaricus* (traíra) foram obtidos comercialmente de uma estação de aquicultura localizada no município de Toledo (PR). Outros dezoito animais foram capturados na Fazenda Experimental Canguiri da UFPR, município de Quatro Barras (PR), bacia da rio Iguaçu. Os animais de Toledo serviram exclusivamente para a exposição ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, e seu respectivo grupo controle (experimento I descrito abaixo). Os animais da Canguiri serviram para a exposição ao Pb^+ , e seu grupo controle (experimento II).

Todos os animais (180,8 g; DP = 57,1 g) foram aclimatados nas condições experimentais por 30 dias: cada animal em um aquário com 30 litros de água de torneira desclorificada; limpeza do aquário a cada 5 dias, com troca de 10 litros da água; influxo de ar constante; temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$; e fotoperíodo (12h luz : 12h escuro). Essas condições foram mantidas e controladas até o fim dos experimentos I e II. O suprimento alimentar deu-se com peixes jovens, indivíduos vivos de *Astyanax* sp. (lambaris) da Bacia do rio Iguaçu (PR). Cada traíra foi alimentada com um lambari (~10% de sua biomassa) a cada cinco dias. Isso para garantir a ingestão num condicionamento comportamental necessário para a administração das doses por via trófica. Além disso RIOS, KALININ E RANTIN (2002) e RIOS et al. (2005), num estudo de restrição alimentar em *Hoplias malabaricus* (até 240 dias de jejum experimental), alimentaram suas traíras do grupo controle com 2% de sua biomassa por dia, quantidade equivalente a aqui utilizada.

Todas as condições experimentais para os bioensaios aqui descritos mantiveram um padrão pré-estabelecido, da chegada do animal ao laboratório até o dia em que foi sacrificado, incluindo: a aclimação às condições experimentais (nunca inferior a 20 dias); a desinfestação do animal (ectoparasitas); a desinfecção prévia da água (ação bactericida e fungicida antes da aclimação); cuidados relativos a fotoperíodo, qualidade da água e suprimento alimentar; e

manipulações como pesagens, distribuição espacial nos aquários e coleta de sangue e órgãos (toda manipulação sempre precedida de anestesia).

Ao final das exposições, após 70 dias (14 doses) todos os indivíduos foram anestesiados em água de torneira desclorificada com MS222 (ácido etil-éster-3-aminobenzóico, Sigma®) a 0,02% (v/v), antes da extração das amostras biológicas, seguida de eutanásia. Aproximadamente 1 ml de sangue de cada animal foi extraído do vaso caudal situado na porção ventral da coluna vertebral, com seringas contendo 0,1 ml de heparina (após encher e esvaziar a seringa), cujas agulhas foram inseridas na região posterior do animal, logo após a nadadeira anal. O sangue foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido até os procedimentos do ensaio bioquímico para atividade da δ -ALAd eritrocitária. Outras alíquotas das mesmas amostras foram sujeitas imediatamente à aferição dos parâmetros hematológicos.

I.2.1.1 Experimento I

Nove traíras foram contaminadas com $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, a partir do $\text{H}_3\text{C-Hg.Cl}$ (diluído em solução aquosa de HCl 1 mM) e 9 traíras foram mantidas como controles. A contaminação ocorreu a cada cinco dias, quando as presas foram injetadas intraperitonealmente com a solução supracitada. Os animais do grupo controle se alimentaram com presas injetadas com HCl 1 mM em solução aquosa. O volume de cada injeção variou de acordo com a biomassa de cada animal experimental, para o estabelecimento da seguinte dose nominal ingerida: 75 ng $\text{H}_3\text{C-Hg}^+.\text{g}^{-1}$. Esta foi determinada por OLIVEIRA RIBEIRO et al. (1999 e 2000) de acordo com dados de estudos em áreas impactadas na Amazônia.

I.2.1.2 Experimento II

Oito traíras foram contaminadas com Pb^{++} , a partir do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ diluído em solução aquosa neutra e nove traíras foram mantidas como controles. A contaminação ocorreu a cada cinco dias, quando as presas foram injetadas

intraperitonealmente com a solução supracitada. Os animais do grupo controle se alimentaram de presas injetadas com água destilada. O volume de cada injeção variou de acordo com a biomassa de cada animal experimental, para o estabelecimento da seguinte dose nominal ingerida: $21 \mu\text{g Pb}^{++}.\text{g}^{-1}$.

Esta dose foi administrada por RABITTO et al. (2005) em *Hoplias malabaricus* e determinada por ALVES COSTA (2001), considerando:

- a) fator de concentração (FC) proposto por VIGHI (1981) para peixes que são consumidores secundários ($\text{FC} = 3.10^3 \text{ g.l}^{-1}$) em ambientes aquáticos contaminados por Pb^{++} (dados de biomonitoramentos);
- b) a média das concentrações de chumbo total na água do rio Ribeira ($27,88 \mu\text{g.l}^{-1}$), município de Registro (SP), durante uma série histórica de monitoramento (CETESB, 1978-97).

Na época da série supracitada, o limite máximo permissível para concentração de chumbo total na água estabelecido pela legislação brasileira, segundo a resolução do CONAMA n. 20 (BRASIL, 1986) era de $30 \mu\text{g.l}^{-1}$.

I.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA

O método empregado para a atividade da δ -ALAd eritrocitária foi modificado de HODSON (1976), HODSON et al (1977), RODRIGUES (1986) e BAINY (1990) e padronizado para *Oreochromis niloticus* por ALVES COSTA (2001). Uma padronização semelhante para *Hoplias malabaricus* foi aqui realizada, incluindo-se parâmetros de cinética enzimática.

Para os ensaios bioquímicos foram necessárias as seguintes soluções:

- a) **Tampão fosfato monossódico/dissódico:** fosfato de sódio dibásico a 0,1 M e fosfato de sódio monobásico a 0,1 M, pH 6,3 (TF);
- b) **Solução A:** Triton X-100 a 0,5% em TF;
- c) **Solução B:** δ -aminolevulinato-hidrocloreto (δ -ALA.HCl) a $804 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ em A;
- d) **Solução P:** solução de ácido tricloroacético (TCA) a $40 \text{ g}.\text{ml}^{-1}$ com cloreto de mercúrio (HgCl_2) a 99,45 mM;

- e) Solução E:** reagente de Ehrlich (reagente de cor): 18,18 mg.ml⁻¹ de p-dimetil-amino-benzaldeído; 3,18 mg.ml⁻¹ de HgCl₂; 76,36% (v/v) de ácido acético glacial; e 18,18% (v/v) de ácido perclórico a 70% (HClO₄).

O sangue total de cada peixe foi descongelado sob gelo moído e uma alíquota serviu à quantificação da hemoglobina (em g.dl⁻¹) pelo método fotométrico da cianometa-hemoglobina (BEUTLER et al., 1995); outra alíquota (25 µl) serviu à hemólise (com Triton X-100) na razão final de 1:12 (v/v) no meio de reação (volume final da reação de 300 µl). O substrato (δ-ALA.HCl) se fez presente na reação (solução B) na concentração final de 4 mM de δ-ALA, exceto nos brancos (solução A) e o preparado foi incubado por 1 h a 37°C. A concentração final de δ-ALA na incubação promoveu sensibilidade (velocidade constante de reação), garantindo a disponibilidade do substrato (saturação). Após a interrupção da reação enzimática com banho de gelo (0°C) seguido de precipitação com TCA/HgCl₂ (adição de 700 µl da solução P, por amostra) as alíquotas foram centrifugadas a 4°C, sob a força de 5000×g por 5 minutos e o sobrenadante (100 µl) pipetado sobre microplaca (96 poços) de leitura em fotômetro. Para os brancos, a adição de 700 µl da solução P se deu antes da incubação, para se evitar qualquer reação com eventuais quantidades de substrato endógeno.

Todo o material usado, até a parada da reação, foi mantido sobre gelo moído ou refrigerado a 4°C. O resultado final do ensaio correspondeu à quantificação do produto da catálise da δ-ALAd, o porfobilinogênio (PBG), que produz a cor vermelho-rósea quando reage com a solução E (100 µl por poço). A intensidade da cor varia com a concentração de PBG e isto é mensurável pelo fotômetro (Tecan Sunshine®) com o filtro para absorção da luz com 550 nm de comprimento de onda. Todas as amostras foram lidas exatamente 15 minutos após a adição do reagente de cor. A atividade pôde ser expressa em unidade relativa, por concentração de hemoglobina, por tempo. Para tal empregou-se a equação:

$$\text{Atividade} = \frac{(\text{absorbância}) \times (D)}{(t) \times ([HB])} \quad (1)$$

Onde:

- a) absorbância:** média de cada ensaio (pelo menos três reações por amostra de sangue) menos absorbância média dos brancos;
- b) D:** fator de diluição do reagente de Ehrlich ($D = 2$);
- c) t:** tempo de incubação (em h);
- d) [HB]:** concentração de hemoglobina no sangue (em $\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$).

Antes da quantificação das amostras experimentais (dos bioensaios), vários ensaios foram conduzidos com amostras de sangue de 20 exemplares de *Hoplias malabaricus* capturados em “pesque-pagues” da bacia do Rio Iguaçu (PR), no intuito de padronizar alguns dos parâmetros de cinética enzimática, a saber: K_M de δ -ALA e temperatura ótima de reação. Esses 20 animais receberam o mesmo tratamento descrito em I.2.1, exceto pela administração dos contaminantes.

I.2.2.1 Análises Estatísticas para δ -ALAd

Os valores numéricos foram analisados com uso do programa GraphPad PRISM®, v.3.00, © 1994-1999. Uma curva de saturação de substrato (hipérbola retangular a partir da equação de Michaelis-Menten) foi calculada, demonstrando a velocidade de reação enzimática em função da concentração de δ -ALA. A plotagem de Lineweaver-Burke e uma curva de temperatura (polinômio de terceira ordem) também ilustram parâmetros da cinética da enzima.

A atividade da δ -ALAd e a concentração de HB foram analisadas por:

- a)** ANOVA a um critério para comparação entre as médias dos grupos, com nível crítico de significância de 5%;
- b)** seguida do teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos (cada qual com todos os outros), com 5% de significância; esse teste serviu para se estabelecer (ou não) a diferença significativa entre os dois grupos controles (um para o Pb^{++} e outro para o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$);
- c)** ou seguida do teste de Dunnett com um nível de significância de 1%; para comparação dos tratamentos com seu respectivo grupo controle,

ou com o grupo resultante da união dos grupos controles, caso fossem estatisticamente iguais.

I.2.3. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Após as exposições as amostras de sangue foram coletadas como descrito em I.2.1, mas não congeladas, e sim sujeitas imediatamente à aferição dos seguintes seguintes parâmetros hematológicos:

- a)** contagem de eritrócitos (RBC), expressa em 10^6 células. μl^{-1} ;
- b)** concentração de hemoglobina no sangue total ([HB]), em g.dl $^{-1}$;
- c)** hematócrito percentual (Ht), que é o volume do sangue total correspondente ao volume dos eritrócitos, expresso em v/v (%);
- d)** volume corpuscular médio (MCV), que é o volume médio dos eritrócitos (em μm^3 ou fl), e calculado pela seguinte equação:

$$\text{MCV} = \frac{\text{Ht (absoluto)} \times 1000}{\text{RBC (} 10^6 \text{ células.}\mu\text{l}^{-1}\text{)}} \quad (2)$$

- e)** quantidade de hemoglobina corpuscular média (MCH), que é a quantidade média de hemoglobina no eritrócito, em massa (pg por célula), e calculada pela seguinte equação:

$$\text{MCH} = \frac{[\text{HB}] \text{ (g.dl}^{-1}\text{)} \times 10}{\text{RBC (} 10^6 \text{ células.}\mu\text{l}^{-1}\text{)}} \quad (3)$$

- f)** concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), que é a [HB] (g.dl $^{-1}$) no sangue total, corrigida para o volume correspondente aos eritrócitos, calculada pela seguinte equação:

$$\text{MCHC} = \frac{[\text{HB}] \text{ (g.dl}^{-1}\text{)}}{\text{Ht (absoluto)}} \quad (4)$$

- g)** contagem diferencial de leucócitos (Lk), expressa em 10^4 células. μl^{-1} ;
- h)** contagem de diferencial neutrófilos (Nt), expressa em número (%) de neutrófilos contados a cada 100 leucócitos contados;
- i)** contagem diferencial de células mononucleadas (Mn), expressa em número de linfócitos mais o número de monócitos a cada 100 leucócitos contados (%);

A contagem de eritrócitos (RBC) deu-se por microscopia de luz visível, em câmara hemocitométrica de Neubauer. O hematócrito percentual (Ht) foi determinado pelo método de micro-hematócrito (HOUSTON, 1990), pelo qual as amostras foram centrifugadas por 5 min. a $2400\times g$. A concentração de hemoglobina no sangue total ([HB]) foi determinada pelo método fotométrico da cianometa-hemoglobina (BEUTLER et al., 1995).

II.2.3.1 Análises Estatísticas para os Parâmetros Hematológicos

A análise estatística dos resultados empregou o programa Prism® v. 3.0, sendo utilizado o teste *t* com um nível crítico de significância de 5%. Devido a distinta procedência dos animais, os experimentos I e II foram analisados em separado.

I.3 RESULTADOS

Não foi observada mortalidade em nenhuma das exposições subcrônicas, indicando que, nas doses administradas, o Pb^{++} e o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ não apresentam efeito agudo sobre as funções vitais de *Hoplias malabaricus*.

Outrossim, todos os animais receberam o mesmo número de doses, o que demonstrou que os xenobióticos, da forma como empregados, não causaram inapetência em *Hoplias malabaricus* durante a exposição subcrônica e também não alteraram seu comportamento de captura de presas em confinamento laboratorial.

I.3.1. ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA

O ensaio para atividade da δ -ALAd mostrou-se um método simples, rápido e de baixo custo, para se evidenciar exposição subcrônicas comparando grupos experimentais, mesmo quando os resultados são expressos em valores relativos de absorbância, como aqui foram.

A concentração de substrato em que a velocidade da reação corresponde à 50% da velocidade máxima, para a δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus* foi de $k_M = 0,3653 \text{ mM}$ ($r^2 = 0,9167$; $n = 7$ animais), 8 reações (concentrações de δ -ALA) por amostra de sangue de cada animal (gráf. 1). A concentração final de δ -ALA utilizada no meio de reação (incubação) foi de 4 mM , cerca de onze vezes o k_M , valor muito próximo do utilizado por HODSON et al. (1977) para quatro espécies de teleósteos ($4,257 \text{ mM}$). Outrossim, o pH do meio de reação (6,3) também foi próximo ao utilizado para as mesmas quatro espécies (pH = 6,3).

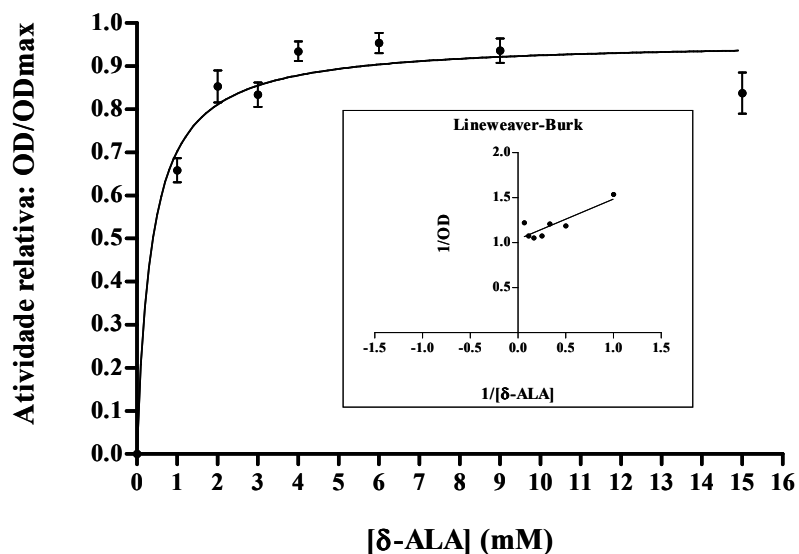
Após aclimação às condições experimentais, a atividade da δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus* aumenta com o acréscimo da temperatura de reação até 56°C ($n = 6$ animais, gráf. 2), a partir da qual declina. A temperatura de reação escolhida, por razões de logística laboratorial, foi de 37°C .

Uma pré-incubação com DNase de fago ($0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$; por 1 h a 37°C), ou outra sem (por 1 h a 37°C) não afetaram significativamente a absorbância obtida,

quando comparadas com o valor de absorbância sem nenhuma pré-incubação ($n = 5$ animais; dados não ilustrados). Contudo ambos os procedimentos de pré-incubação aumentaram o volume de sangue total disponível para pipetagem, após o descongelamento das amostras, sendo o uso da DNase mais eficiente. Isso porque ao se congelar o sangue (hemólise) há a liberação do DNA dos eritrócitos, o que dá uma consistência gelatinosa a uma fração da amostra. Com as amostras provenientes do bioensaio não foram realizadas as pré-incubações supracitadas, mas o problema foi resolvido coletando-se um volume maior de sangue, do que o necessário para o ensaio bioquímico.

As exposições in vivo a ambos os xenobióticos (Pb^{++} e H_3C-Hg^+) resultaram em inibição significativa (Dunnett: $p < 0,01$) da δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus* (gráf. 3). Não houve mortalidade durante o bioensaio.

GRÁFICO 1 – CURVA DE SATURAÇÃO DE SUBSTRATO (δ -ALA) PARA A δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE *HOPLIAS MALABARICUS*



FONTE: O autor

NOTAS: Regressão (hipérbola retangular) a partir da Equação de Michaelis-Menten: $r^2 = 0,917$. Médias \pm erro padrão ($n = 7$ animais), 8 reações (concentrações de δ -ALA) por amostra de sangue de cada animal.

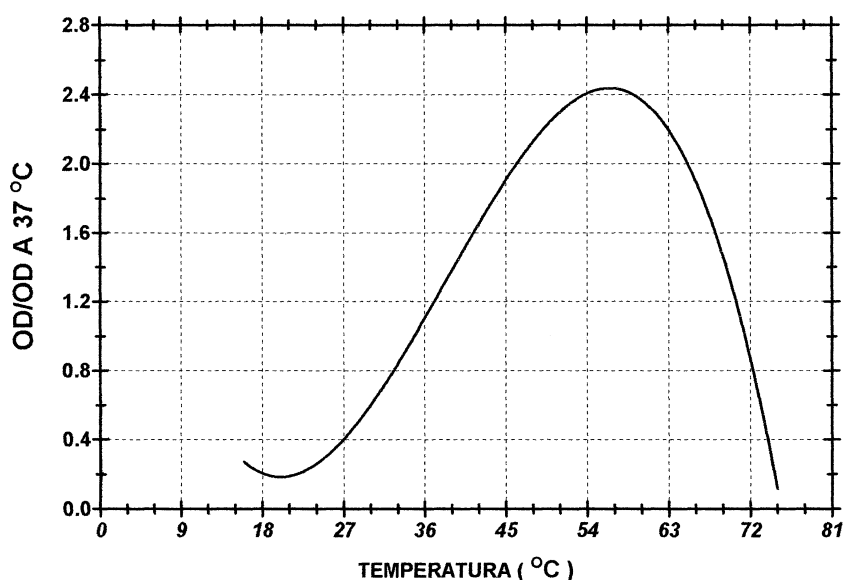
Velocidade da reação corresponde à 50% da velocidade máxima: $k_M = 0,3653$ mM.

Gráfico inserido: plotagem de Lineweaver-Burke.

Incubação a 37°C por 1 hora; valores de absorbância a 550 nm (absorbância) divididos pelo maior valor de absorbância obtido em cada animal.

Sistema inglês de escrita numérica.

GRÁFICO 2 – ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE *HOPLIAS MALABARICUS* EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

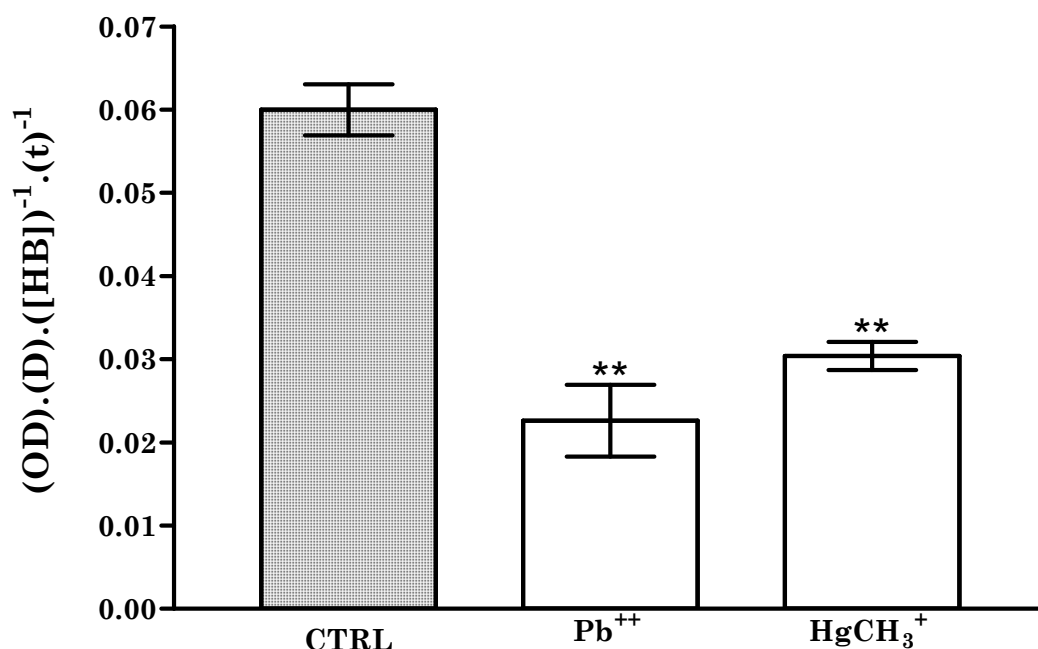


FONTE: O autor

NOTAS: Polinômio de 3.^a ordem ($r^2 = 0,59$); $n = 6$ animais; valores de absorbância a 550 nm divididos pela absorbância média obtida a 37°C para os 6 animais; incubações de 1 hora.

Sistema inglês de escrita numérica.

GRÁFICO 3 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA DE TRAÍRA (*HOPLIAS MALABARICUS*) EXPOSTAS POR VIA TRÓFICA AO Pb^{++} E AO H_3C-Hg^+ , POR 70 DIAS (14 DOSES)



FONTE: O autor

NOTAS: **CTRL:** 2 grupos controles (n = 9 + 9 animais).

Pb⁺⁺: grupo exposto a 21 $\mu g Pb^{++}.g^{-1}$ de biomassa, a cada 5 dias (n = 8 animais).

H₃C-Hg⁺: grupo exposto a 75 ng H₃C-Hg⁺.g⁻¹ de biomassa, a cada 5 dias (n = 9).

Valores de absorbância aferidos a 550 nm.

Incubação de 1 hora a 37°C.

Sistema inglês de escrita numérica.

I.3.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A tabela 1 demonstra as médias dos valores obtidos para os parâmetros hematológicos aqui considerados.

TABELA 1 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ANALISADOS EM *HOPLIAS MALABARICUS* APÓS EXPOSIÇÃO TRÓFICA ÀS DOSES DE 75 ng H₃C-Hg⁺.g⁻¹ E 21 µg Pb⁺⁺.g⁻¹, A CADA 5 DIAS, POR UM PERÍODO TOTAL DE 70 DIAS (14 DOSES)

PARÂMETROS	EXPERIMENTO I		EXPERIMENTO II	
	Origem: Toledo (PR)		Origem: FE Canguiri (UFPR)	
	Controle ± EPM	H ₃ C-Hg ⁺ ± EPM	Controle ± EPM	Pb ⁺⁺ ± EPM
n ⁽¹⁾	9	9	6	6
RBC ⁽²⁾	1,63 ± 0,06	*1,91 ± 0,09	1,90 ± 0,13	1,99 ± 0,07
[HB] ⁽³⁾	5,07 ± 0,11	***6,02 ± 0,19	5,62 ± 0,60	5,27 ± 0,38
Ht ⁽⁴⁾	25,33 ± 1,14	***35,22 ± 1,27	23,33 ± 0,80	25,67 ± 1,02
MCV ⁽⁵⁾	155,53 ± 5,38	***185,4 ± 3,87	126,21 ± 11,12	129,31 ± 5,32
MCH ⁽⁶⁾	31,35 ± 1,06	31,90 ± 1,33	30,74 ± 4,78	26,45 ± 1,58
MCHC ⁽⁷⁾	20,36 ± 1,07	*17,23 ± 0,69	23,90 ± 2,02	20,44 ± 0,78
Lk ⁽⁸⁾	3,96 ± 0,26	***6,40 ± 0,31	0,37 ± 0,14	0,25 ± 0,11
Nt ⁽⁹⁾	3,78 ± 0,62	*8,89 ± 1,73	3,33 ± 1,23	3,83 ± 0,87
Mn ⁽¹⁰⁾	96,22 ± 0,62	*91,11 ± 1,73	96,67 ± 1,23	96,17 ± 0,87

FONTE: o autor

NOTAS: Teste *t* realizado para os experimentos I e II, em separado (*p < 0,05; ***p < 0,001).

Dados expressos em média (± erro padrão médio).

- (1) n: número de animais no grupo.
- (2) RBC: contagem de eritrócitos (10⁶ células.µl⁻¹).
- (3) [HB]: concentração de hemoglobina (g.dl⁻¹).
- (4) Ht: hematócrito percentual (%).
- (5) MCV: volume corpuscular médio (µm³).
- (6) MCH: hemoglobina corpuscular média (pg.célula⁻¹).
- (7) MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média (%).
- (8) Lk: contagem de leucócitos (10⁴ células.µl⁻¹).
- (9) Nt: contagem de neutrófilos (neutrófilos.[100 leucócitos contados]⁻¹).
- (10) Mn: contagem de células mononucleadas ([linfócitos + monócitos].[100 leucócitos contados]⁻¹)

I.4 DISCUSSÃO

Embora o Pb^{++} não sofra biomagnificação, ou seja, um aumento de concentração com a ascendência da cadeia trófica, muitos organismos aquáticos, inclusive peixes, podem absorver e acumular altas concentrações de chumbo (PAIN, 1995) e em geral considera-se que este metal possui efeitos cumulativos em peixes (VIGHI, 1981). Contudo sua biodisponibilidade e a tendência de organismos aquáticos em acumulá-lo em seus tecidos não são temas suficientemente elucidados, quando em relação a estudos com outros metais.

Sabe-se que em trabalhadores sob exposição ocupacional ao chumbo, 35–81% do metal no sangue está associado à δ -ALAd eritrocitária, com uma capacidade limitada a $850 \mu g.l^{-1}$ (dissociação constante de $1,5 \mu g.l^{-1}$) e que nenhuma ligação do chumbo com a hemoglobina foi encontrada (BERGDAHL et al., 1998).

Os resultados confirmam a inibição da δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus*, após a exposição experimental trófica e subcrônica ao Pb^{++} (gráf. 3). Pode-se inferir com segurança que *Hoplias malabaricus* absorveu pelo trato intestinal, o Pb^{++} contido nas doses ingeridas. ALVES COSTA (2001) encontrou inibição semelhante para *Oreochromis niloticus*, em exposição aguda por via hídrica (semi-estática).

De outra forma, CAMPANA, SARASQUETE e BLASCO (2003) não encontraram inibição da δ -ALAd do fígado, rim e sangue de *Halobatrachus didactylus*, sete dias após a injeção única (dose intraperitoneal) de $1 ng Pb^{++}.g^{-1}$ de biomassa. O metal também não causou peroxidação lipídica em células do rim e do fígado, embora tenha se acumulado nos tecidos de acordo com a seguinte ordem: rim > fígado > sangue. Os teores de chumbo no sangue dos animais injetados se igualaram aos dos animais controles, demonstrando que a dose estudada foi muito baixa para inibir a δ -ALAd eritrocitária.

O mercúrio é um poluente ubíquo que desregula muitas rotas bioquímicas em organismos. Recentemente experimentos com ratos demonstraram inibição da atividade da δ -ALAd proveniente do rim de ratos injetados por via subcutânea

com 17 $\mu\text{mol HgCl}_2.\text{kg}^{-1}$ (PEROTTONI et al., 2004a, 2004b). A interação do Hg^{++} com os grupos sulfidrila (STOHS e BAGCHI, 1995) no sítio ativo da enzima podem explicar tal fenômeno.

Neste trabalho, uma exposição por via trófica de 75 ng $\text{H}_3\text{C-Hg}^+.\text{g}^{-1}$ de biomassa, a cada 5 dias e por 70 dias (14 doses) inibiu consistentemente (49% sobre a atividade controle; $p < 0,01$; gráf. 3) a δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus*. Este é o primeiro estudo experimental que demonstra o efeito do $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ em baixas doses sobre a atividade da δ -ALAd. Uma hipótese para explicar a inibição seria a ligação do organometal com os grupos sulfidrila, no sítio ativo da δ -ALAd. Em adição pode-se deduzir danos oxidativos em tecidos hematopoiéticos e outros.

Como consequência da exposição a metais pesados já foram relatadas, por STOHS e BAGCHI (1995) e FARINA et al. (2003), a peroxidação lipídica, homeostase alterada de cálcio e componentes sulfidrílicos e danos no DNA. Entre outros metais pesados o mercúrio e o chumbo podem interagir com a glutathione reduzida (GSH) e outros componentes que contenham grupos $-\text{SH}$, como cisteínas (livres ou não) e muitas proteínas, diminuindo os teores celulares de grupos $-\text{SH}$ em estado reduzido, os quais atuam como “tampões oxidativos” naturais. Isso resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (STOHS e BAGCHI, 1995).

De fato, outro experimento realizado pelo Laboratório de Toxicologia Celular (SCB-UFPR), com a mesma dose de Pb^{++} utilizada neste estudo e também administrada a cada 5 dias, demonstrou forte evidência de danos genéticos no rim anterior (tecido hematopoiético) de *Hoplias malabaricus*: quebras em cromátides, inversões pericêntricas e fragmentos cromossômicos (CESTARI et al., 2004). A frequência das alterações cromossômicas aumentou com o tempo de exposição (de 4 para 8 doses) e danos no DNA de eritrócitos foram observados pelo teste cometa após 13 doses.

O acúmulo celular de δ -ALA (precursor do grupo HEME) está envolvido com danos oxidativos devido a produção de espécies reativas de oxigênio (DEMASI et al., 1996). Portanto, pode-se supor com a inibição da δ -ALAd, um efeito adverso indireto (em relação ao efeito oxidativo direto supracitado) do Pb^{++} e do $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$

nas estruturas do DNA e cromossômica de vários tipos celulares, notoriamente eritrócitos (ou seus precursores), hepatócitos e células renais.

Tal efeito oxidante também está relacionado a uma suposta “quebra” da estrutura macromolecular do citoesqueleto, pois interações químicas com a rede de microtúbulos podem gerar genotoxicidade. O surgimento de micronúcleos pode ser consequência de interações de metais com a tubulina e/ou a quinesina. Há constatação da indução dose-dependente de micronúcleos, por sais de chumbo e mercúrio, que interferem *in vitro* com a formação dos microtúbulos, e alteram a segregação cromossômica via interação com as proteínas do citoesqueleto (THIER et al., 2003).

Em adição, ALVES COSTA (2001), RABITTO et al. (2005) e MELA et al. (submetido) demonstraram que o Pb^{++} e o H_3C-Hg^+ induzem alterações morfológicas na ultra-estrutura de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, e que isso está relacionado ao tempo de exposição; e ainda sugerem como causa, mudanças operacionais na dinâmica dos filamentos intermediários (lâmina nuclear) ou das tubulinas (microtúbulos).

Trutas expostas via hídrica ao chumbo, em concentrações de 10, 75 e 300 $\mu g.l^{-1}$, por 30 dias, apresentaram 21, 74 e 86% de inibição da δ -ALAd eritrocitária, respectivamente, apresentando anemia somente na concentração mais alta (JOHANSSON-SJOBECK e LARSSON, 1979). Segundo os autores a enzima possui grande capacidade de reserva, já que as suas funções normais (hematopoiese em nível sistêmico) são possíveis apenas com 25% de sua capacidade catalítica normal.

Isso demonstra a importância da enzima nos organismos, o que também está implícito no fato de sua estrutura ter sido bem conservada no processo evolutivo, já que integra sistemas imprescindíveis na célula eucariótica ou em bactérias aeróbicas.

Desta ampla e crucial ocorrência têm-se que sua atividade deva ser utilizada como biomarcador sensível em programas de biomonitoramento. Nesse âmbito, a inibição da δ -ALAd eritrocitária mostra-se como um eficiente biomarcador de efeito para danos oxidativos em sistemas hematológicos (ou

outros tecidos e processos celulares), como pode-se deduzir a partir de: MONTEIRO et al. (1985), STOHS e BAGCHI (1995), DEMASI et al. (1996), FARINA et al. (2003), GURER-ORHAN, SABÝR e ÖZGÜNES (2004), PEROTTONI et al. (2004a, 2004b), CESTARI et al. (2004).

Outrossim, a atividade da δ -ALAd serviu como biomarcador de exposição à metais pesados divalentes e suas fontes, como em JOHANSSON-SJOBECK e LARSSON (1979), MARTIN e BLACK (1996, 1998), BURDEN, SANDHEINRICH e CALDWELL (1998), OGUNSEITAN, YANG e ERICSON (2000), CAMPANA, SARASQUETE e BLASCO (2003).

Os parâmetros hematológicos aferidos com o sangue de *Hoplias malabaricus* não apresentaram alterações relacionadas com as exposições ao Pb^{++} , quando este grupo foi comparado com seu controle. Contudo todos os parâmetros aferidos, exceto MCH, apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado com H_3C-Hg^+ e seu grupo controle.

Os valores de Ht observados em sangue de *Hoplias malabaricus* nos grupos controles (25,33% e 23,33%) aproximam-se de outros, relatados para espécies de peixes tropicais como *Ictalurus punctatus* (23,9%; LIM et al., 2000) e *Colossoma macropomum* (20–23%; AFFONSO et al., 2002); mas são distintos daqueles de outras espécies como *Oncorhynchus mykiss* (35,6%; MATTSSON et al., 2001) e *Rhandia quelen* (35,3%; LERMEN et al., 2004).

Para *Hoplias malabaricus* da bacia do rio Mogi-Guaçu, São Carlos (SP), RIOS, KALININ e RANTIN (2002) e RIOS et al. (2005) encontraram valores de RBC ($\approx 2.10^6$ células por μl ou mm^3) e de Ht ($\approx 26,5\%$), próximos daqueles aqui aferidos nos animais controles.

Metais pesados divalentes, como o Pb^{++} , o Cd^{++} ou o Hg^{++} , causam anemia em peixes expostos por longos períodos (HEATH, 1995), ou a redução do Ht de peixes expostos ao Cr^{++} de forma aguda (LOHNER et al., 2001); este último fenômeno também foi observado por MATTSSON et al. (2001) em *Oncorhynchus mykiss* sob efeitos de restrições na dieta e exposição a efluentes orgânicos de uma fábrica de papel.

Para *Barbus conchoni* foi constatada a redução de 12–31% nos valores de RBC, Ht, [HB] e MCV, após exposição hídrica a 47 $\mu\text{g Pb}^{++}.\text{l}^{-1}$ por até 60 dias (TEWARI; GILL; PANT, 1987). Esta redução não foi observada para *Hoplias malabaricus* no presente estudo. Por outro lado, para a exposição trófica ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ (em dose bem inferior que a usada para o Pb^{++}) observou-se após 70 dias um aumento nos valores de RBC, [HB], Ht, MCV, Lk, e Nt.

O aumento em RBC, [HB] e Ht está relacionado à exposição aguda de *Prochilodus scrofa* (curimatá) ao CuSO_4 , e os valores normais só foram reestabelecidos após o sétimo dia de transferência dos animais para água livre de cobre (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

Os resultados observados aqui para o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ estão de acordo com CHOWDHURY, McDONALD e WOOD (2004), que mencionam que um acréscimo em [HB] e Ht está relacionado com um aumento da capacidade de transporte de O_2 , quando ocorrem danos nas trocas gasosas em tecidos, durante hipoxia e exposições crônicas ou agudas a metais em solução (Cd^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Al^{++} e Ni^{++}). MASSARO (1974) relatou que o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ pode se ligar de forma reversível com as sulfidrilas ($-\text{SH}$) da HB de eritrócitos de truta e que isso está relacionado ao transporte de O_2 .

Um aumento em RBC, como aqui observado para a exposição ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, geralmente está correlacionado a um aumento em [HB] e Ht (HEATH, 1995), e de acordo com AFFONSO et al. (2002), o acréscimo em valores de RBC sugere um aumento na capacidade de transporte de O_2 pelo sangue.

Valores de RBC de peixes também podem ser afetados por outros poluentes, como em *Oncorhynchus mykiss* após exposição aguda ao alumínio (ALLIN e WILSON, 2000) e em *Labeo rohita*, após exposição a teores subletais de cipermetrina e carbofurano (ADHIKARI et al., 2004). Em adição, CHOWDHURY, McDONALD e WOOD (2004) discutem que outros mecanismos de toxicidade podem estar associados com a capacidade de transporte de O_2 , como no caso em que o Cd^{++} , após exposição trófica de *Oncorhynchus mykiss*, interage com hemoproteínas em células que desencadeiam a expressão do hormônio

eritropoetina, uma precursora da produção de eritrócitos e hemoglobina durante deficiência de O₂ (hipoxia).

Um outro mecanismo possivelmente envolvido seria a inibição da absorção de ferro a partir do intestino causada pelo Cd⁺⁺ (HEATH, 1995) e a conseguinte desregulação do metabolismo desse metal, encurtando o tempo de vida dos eritrócitos (LIU et al., 1999), atrasando a maturação dos eritrócitos, ou causando o colapso dessas células (HOUSTON et al., 1993), por aumentar a fluidez de suas membranas causando lise, o que foi atribuído a peroxidação lipídica no sangue de peixes (PALECE; MAJEWSKI; KLAVERKAMP, 1993).

De fato o acréscimo nos valores de RBC, [HB] e Ht, aqui encontrados para o grupo exposto ao H₃C-Hg⁺, acompanhou a inibição consistente da atividade da δ -ALAd eritrocitária de *Hoplias malabaricus* (55,51% sobre a atividade controle; ver I.4), indicando a presença do organometal no sangue dos animais expostos. Ressalta-se que a síntese do grupo HEME em tecidos hematopoiéticos é essencial para o transporte de O₂ pela HB no sangue. O comprometimento desse tipo de organização tecidual, nas traíras que ingeriram H₃C-Hg⁺, parece ter sido contornado por adaptações fisiológicas que permitiram a sobrevida do animal.

Após 30 dias de jejum experimental de *Hoplias malabaricus*, RIOS et al. (2005) relatam um decréscimo em eritropoiese evidenciado pela redução na contagem de eritroblastos. Após 150–240 dias isso se refletiu no decréscimo dos valores de Ht, e após 240 dias, no decréscimo dos valores de RBC. Os valores normais desses parâmetros não foram recuperados com a realimentação, após 240 dias de jejum. Durante 60–150 dias de jejum houve um acréscimo de [HB], que logo depois (180 dias) refletiu-se num aumento de MCH e MCHC, o que pôde ser explicado com a manutenção do volume médio dos eritrócitos (MCV).

De outra forma, o aumento no tamanho dos eritrócitos (MCV), nas amostras de sangue do grupo aqui exposto ao H₃C-Hg⁺, sugere a presença de um grande número de células com tamanho e “idade” avançadas, como descrito por HARDIG e HOGLUND (1983). Como a quantidade média de hemoglobina por célula (MCH) não sofreu acréscimo, houve uma “diluição” da concentração média de hemoglobina por célula (decréscimo no valor médio de MCHC), acompanhada

de um aumento na concentração média de HB no sangue total. Isso demonstra que no momento em que as amostras de sangue foram coletadas (após 70 dias de exposição) a taxa de eritropoiese estava comprometida (decréscimo). Contudo observou-se um aumento na contagem de eritrócitos (RBC), aqui atribuído à não distinção, na ocasião da contagem, entre eritroblastos e eritrócitos maduros.

Portanto há fortes evidências de que o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ tenha causado alterações na atividade hematopoiética e no mecanismo de renovação do estoque de eritrócitos em circulação de *Hoplias malabaricus*, após 70 dias de exposição pela dieta. Essa resposta fisiológica não ocorreu para os animais expostos ao Pb^{++} , pois embora tenha sido neles constatada a inibição da δ -ALAd eritrocitária, não houve acréscimo em valores de RBC, [HB] e Ht. Isso sugere que mecanismos adicionais estejam envolvidos com o efeito tóxico do $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ em *Hoplias malabaricus*.

Por outro lado há evidências histopatológicas e ultra-estruturais encontradas pelo Laboratório de Toxicologia Celular (SCB-UFPR), que reportam danos causados pelo Pb^{++} em rim anterior e fígado (órgãos hematopoiéticos em peixes) de *Hoplias malabaricus* (ALVES COSTA, 2001; RABITTO et al., 2005).

Em vista desses fatos pode-se inferir que a espécie *Hoplias malabaricus* é bastante resistente a condições adversas, podendo contornar situações de estresse ambiental com adaptações fisiológicas. A persistência na ocorrência de populações de traíras em locais reconhecidamente contaminados por Pb^{++} , contribui à tal dedução, como pode ser observado no Alto Vale do rio Ribeira (SP/PR), onde durante 4 décadas o rejeito de beneficiamento (concentração por flotação) do minério de chumbo foi despejado diretamente no sistema de drenagem da bacia (MORAES, 1997).

Sabe-se que alterações nos valores da contagem diferencial de leucócitos (Lk) após exposições a poluentes podem estar associadas a um decréscimo em imunidade não específica de peixes. Como efeito do $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, observou-se o aumento consistente no valor de Lk, quando comparado ao grupo controle; e numa comparação paralela, quando frente ao resultado obtido em relação ao Pb^{++} (ver tab. 1).

Segundo GILL e PANT (1987), SINGH e REDDY (1990), e WEDEMEYER, BARTON e MCLEAY (1990) este resultado é reconhecido como um sensível indicador de estresse em peixes, o que também foi constatado por ADHIKARI et al. (2004) em *Labeo rohita* expostos a pesticidas e por CHOWDHURY, McDONALD e WOOD (2004) em *Oncorhynchus mikiss* expostos ao Cd^{++} de forma crônica.

Ressalta-se, contudo que os valores de Lk entre os animais controles das duas regiões de origem de *Hoplias malabaricus* são muito diferentes, o que não permite uma comparação direta (com os dados absolutos) e concomitante para o efeito dos dois xenobióticos. De fato a Lk é uma variável susceptível a diferentes padrões patológicos encontrados em peixes de diferentes regiões (HEATH, 1995).

Considera-se aqui que o acréscimo em Lk causado pelo $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ em *Hoplias malabaricus* caracteriza uma imuno-estimulação, esta relacionada com a ocorrência de danos teciduais como necroses, relatadas em diferente tecidos de traíras expostas ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002a). Por outro lado, a imunossupressão foi observada em *Astyanax bimaculatus* expostos ao tributílo-estanho (TBT) após doses similares administradas por via intraperitoneal (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002b), mas não foi observada em *Hoplias malabaricus* após exposição trófica ao TBT (RABITTO et al., 2005).

De acordo com WEDEMEYER, BARTON e MCLEAY (1990), a supressão do sistema imunológico aumenta a susceptibilidade de peixes a patógenos, um aspecto importante quando se considera a presença de metais pesados em ecossistemas aquáticos.

CAPÍTULO II

TEORES TECIDUAIS DE METALOTIONEÍNA EM TRAÍRA (*HOPLIAS MALABARICUS*)

COLABORAÇÃO :

Sibelle Christine Glaser Jakobi, bióloga

Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis

II.1 INTRODUÇÃO

A metalotioneína (MT) é uma estrutura polipeptídica pequena (cerca de 6 a 7 kDa ou ~ 60 aminoácidos) com nenhum aminoácido aromático ou heterocíclico e com 1/3 desses resíduos representado por cisteínas (~ 30), daí sua composição marcadamente tiólica, o que faz da estrutura um forte ligante de metais pesados: 7 átomos-grama de metal *per* mol de MT (VALLEE, 1991). Sua expressão celular é induzível por cádmio, cobre, zinco, mercúrio, cobalto, bismuto, níquel e prata (MELANCON, 1995) e por metabólitos não metálicos como glicocorticóides, glucagon, interleucina 1, catecolaminas, progesterona, estrógenos, etanol, interferon e espécies reativas de oxigênio, como relatado por VALLEE (1991), KÄGI (1991), VASAK e HASLER (2000).

Dentre os processos celulares e fisiológicos em que a MT está envolvida, destacam-se: regulação do metabolismo de zinco e cobre (influxo, distribuição, estocagem e excreção); infecções e inflamações; estresses oxidativo e físico; fome; mobilização de zinco como componente integral para a síntese de enzimas e proteínas; apoptose; crescimento neuronal; “imobilização” citosólica de metais pesados e aumento da tolerância fisiológica aos mesmos. Para uma ampla abordagem acerca dessas informações sobre as MTs, ver VALLEE (1991), TEMPLETON e CHERIAN (1991), BREMNER (1991), McDONALD e WOOD (1993), HEATH (1995), VASAK e HASLER (2000).

Desde a descoberta das MTs (fim da década de 50) consideráveis avanços no conhecimento relativo ao isolamento, purificação, caracterização molecular, seqüenciamento de aminoácidos (e genes relacionados) e regulação de sua expressão na célula têm sido obtidos: cerca de 200 seqüências de aminoácidos distintas são atribuídas à MT de diferentes espécies (VALLEE, 1991; VASAK e HASLER, 2000). Nesse âmbito, grande parte dos métodos usados para o estudo das MTs, induzida por metais exógenos, são mais caros e demorados que os métodos que envolvem a quantificação dos metais *em si* (MELANCON, 1995) ou a avaliação dos efeitos desses metais em outras instâncias do organismo, sem o objetivo da caracterização molecular.

O desenvolvimento de métodos indiretos para quantificação de MT em tecidos forneceu uma ferramenta útil ao emprego de sua expressão celular como biomarcador de exposições a metais pesados. Tais métodos valem-se de propriedades intrínsecas da molécula de MT, como a afinidade a metais e estabilidade em altas temperaturas: saturação com a prata (SCHEUHAMMER e CHERIAN, 1991); ensaio de afinidade de Cd-hemoglobina com quantificação diferencial do ^{109}Cd excedente, não ligado às MTs (EATON e CHERIAN, 1991) e ensaios fotométricos que quantificam grupos $-\text{SH}$ nas amostras (VIARENGO et al., 1997, 2000), entre outras possíveis variações.

O mercúrio inorgânico tem grande afinidade à MT e substitui o cobre, o zinco ou o cádmio complexados à molécula (VALLEE, 1991). Em um salmonídeo a exposição crônica ao HgCl_2 pode diminuir a concentração normal de cobre e zinco em tecidos; o metilmercúrio aparentemente não se liga às MTs de peixes, mas pode fazê-lo com outros componentes celulares de natureza protéica (HEATH, 1995). O cádmio induz a transcrição do RNA_m de MT em *Lithognathus mormyrus* (TOM et al., 1999). Da mesma forma o cobre pode induzir a produção de MT hepática em bagres (SCHLENK; DAVIS; GRIFFIN, 1999). O chumbo parece não induzir a produção de MT em peixes (HEATH, 1995) embora o faça em ratos (acetato de chumbo) (TEMPLETON e CHERIAN, 1991).

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo é a padronização do método de VIARENGO et al. (1997), pois esse foi aqui modificado, para a quantificação indireta das MTs em tecidos de *Hoplias malabaricus*. O intuito com tal método é corroborar o emprego de uma resposta biológica (expressão das MTs em tecidos) como biomarcador efetivo para exposições subletais e subcrônicas por via trófica. Nesse caso foi testado o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$, como agente indutor ou supressor da expressão das MTs no fígado e em brânquias.

II.2 MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1 BIOENSAIO

Dezoito espécimes de *Hoplias malabaricus* (traíra) do bioensaio descrito na seção I.2.1.1 foram utilizados. Nove traíras foram contaminadas com $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ e nove serviram de controle. Amostras de fígado (lobo esquerdo posterior) e do segundo arco branquial foram excisadas e mantidas a -75°C até as análises.

II.2.2 QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE MTs

Para a quantificação da MT foi utilizado o método proposto por VIARENGO et al. (1997) para tecidos de moluscos, adaptado para tecidos de peixes. Este método consiste no monitoramento fotométrico da reação de ELLMAN et al. (1961), ocorrida entre as sulfidrilas das MTs e o DTNB. As MTs são purificadas numa extração fracionada a partir do sobrenadante do homogenato tecidual, que após tratado com etanol e clorofórmio sofre adição de HCl para precipitação das proteínas. O precipitado é então centrifugado e lavado para remoção de moléculas de baixa massa que contenham sulfidrilas ($-\text{SH}$):

- a) endógenas: cisteínas livres, GSH;
- b) exógenas: β -mercapto-etanol acrescentado como agente redutor na homogeneização.

O método é indireto, pois obtém a concentração de grupamentos sulfidrila ($-\text{SH}$) nos tecidos, ao invés de aferir a quantidade absoluta de MTs presente nas amostras.

As alterações aqui realizadas no método proposto por VIARENGO et al. (1997) foram:

- a) adaptação para leitura fotométrica em microplacas de 96 poços (o autor utiliza leitura em cubetas), para tal foi calculado um fator de correção da quantidade de $-\text{SH}$ (nmol) na leitura (microplaca), em relação ao volume em que ocorreu a reação de cor (4,5 ml):

- para fígado: $\text{nmol } -\text{SH} = V \text{ (l)} \times (4500 \div 200) \times [-\text{SH}] \text{ (mol.l}^{-1}) \times 10^9$
- para brânquia: $\text{nmol } -\text{SH} = V \text{ (l)} \times (4500 \div 300) \times [-\text{SH}] \text{ (mol.l}^{-1}) \times 10^9$
- b)** os resultados foram expressos em quantidade (nmol) de $-\text{SH}$ por unidade de massa de tecido (g), sendo que tal valor de massa foi corrigido em relação às diluições do homogenato inicial de brânquias (2,3%, v/v), e de fígado (2,9%, v/v), e em relação à massa específica (d) de cada amostra de tecido:
 - massa final para brânquias:

$$m_f \text{ (g)} = \text{massa inicial da amostra (g)} \times 0,023 \times d \text{ (g.ml}^{-1}\text{)};$$
 - massa final para fígado:

$$m_f \text{ (g)} = \text{massa inicial da amostra (g)} \times 0,029 \times d \text{ (g.ml}^{-1}\text{)};$$
- c)** a diminuição na força centrífuga aplicada ao homogenato, para obtenção do sobrenadante com MTs (de $30.000 \times g$ para $21.460 \times g$), mas com um aumento no tempo de centrifugação (de 20 para 30 min.);
- d)** a substituição do filtro de leitura (412 nm) por um de 405 nm (disponível no fotômetro Tecan Sunshine®); tal substituição, segundo dados obtidos de VIARENGO et al. (1997), não altera os resultados de absorbância;
- e)** a secagem do último precipitado (*pellet*) obtido (contendo MTs) foi sobre a bancada, com auxílio de papel filtro, e não com fluxo de gás N_2 , como no método original.

Para a quantificação das amostras por interpolação, o método utiliza uma curva padrão de concentrações de glutathiona ([GSH]) como referência (com regressão linear significativa: $r^2 > 0,95$). Essa curva foi obtida durante e para cada ensaio bioquímico, tendo as mesmas variantes experimentais das amostras.

O apêndice 1 compila numa planilha todos os procedimentos do método empregado, bem como as concentrações e volumes utilizados.

II.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

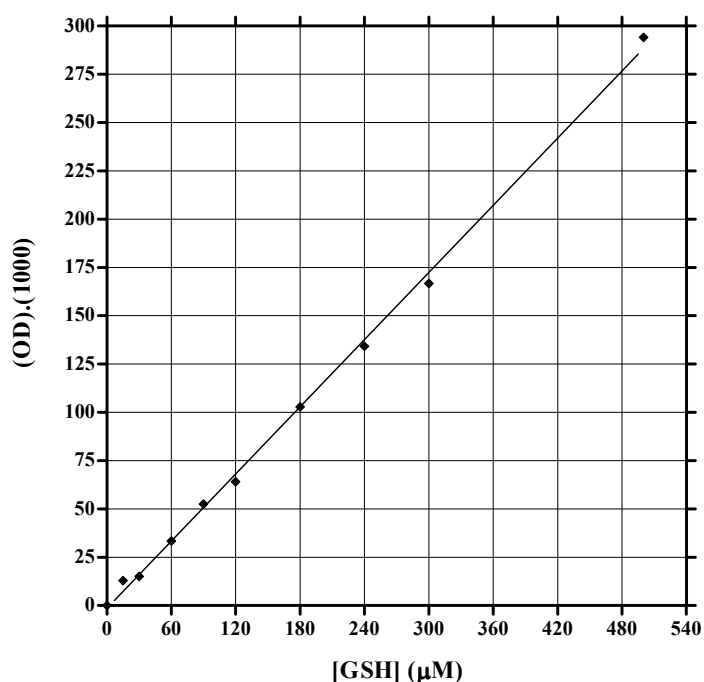
A análise estatística dos resultados empregou o programa Prism® v. 3.0, sendo utilizado o teste *t*, com um nível crítico de significância de 5%.

II.3 RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre as médias das quantidades de MTs aferidas nas amostras de fígado e brânquias, entre os grupos tratado ($\text{H}_3\text{C-Hg}^+$) e controle (figs. 5 e 7). De fato a variação dos resultados foi alta, com a sobreposição dos erros padrões nas amostras de fígado, e com alto coeficiente de variação: 74% em fígado e 45% em brânquias. Não houve a possibilidade de discriminação dos animais tratados, dos controles.

As amostras de fígado apresentaram uma massa específica média de $0,84 \text{ g.ml}^{-1}$ (com desvio padrão de $0,08 \text{ g.ml}^{-1}$); e as amostras de brânquia se igualaram à densidade da água (com desvio padrão desprezível).

GRÁFICO 4 – CURVA PADRÃO (REGRESSÃO LINEAR) DE CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA ([GSH]) USADA COMO REFERÊNCIA NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO DE *HOPLIAS MALABARICUS*, POR INTERPOLAÇÃO



FONTE: O autor

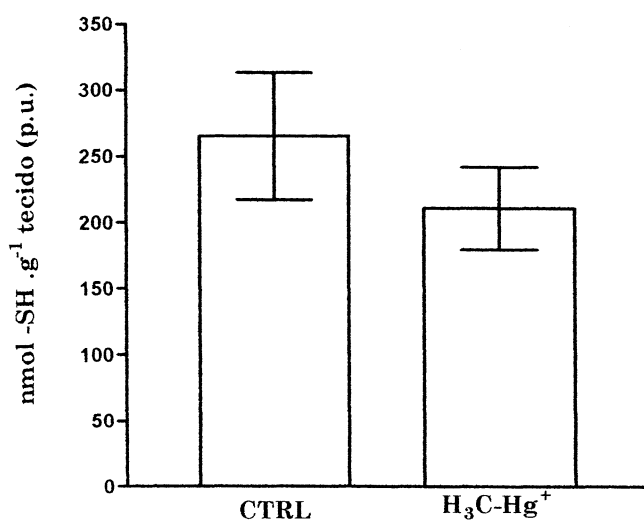
NOTAS: Concentrações finais de glutatona ([GSH]) diluída em EDTA a 2 mM e HCl 0,5 N.

O fotômetro considera o padrão de [GSH] = 0 como branco.

O volume final de leitura foi de 200 μl.

$Y = (0,5794).X - 1,381$; $r^2 = 0,9982$

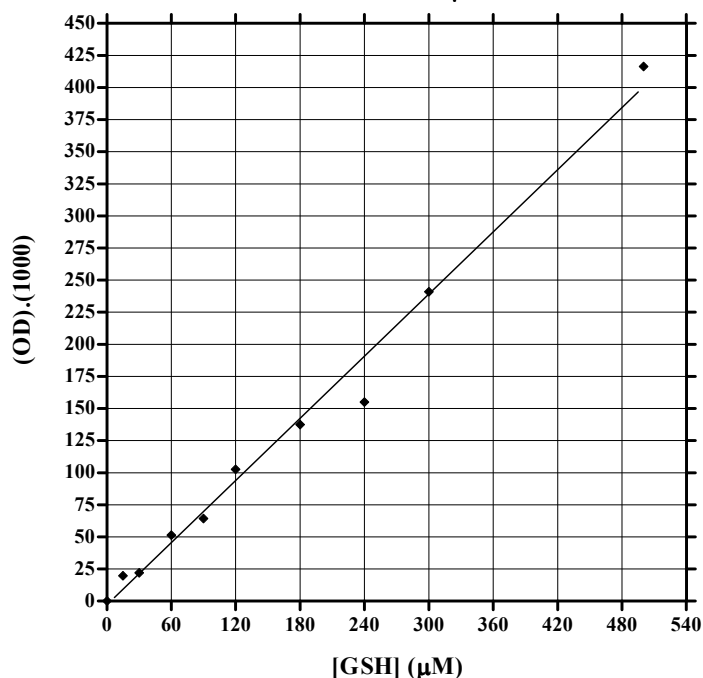
GRÁFICO 5 – TEORES TECIDUAIS DE SULFIDRILA (nmol de -SH) POR UNIDADE DE MASSA DA AMOSTRA DE FÍGADO (g) DE *HOPLIAS MALABARICUS* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A 75 ng H_3C-Hg^+ .g⁻¹ DE BIOMASSA, POR 70 DIAS (14 DOSES)



FONTE: O autor

NOTAS: n = 8 animais por grupo.

GRÁFICO 6 – CURVA PADRÃO (REGRESSÃO LINEAR) DE CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA ([GSH]) USADA COMO REFERÊNCIA NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BRÂNKIAS DE *HOPLIAS MALABARICUS*, POR INTERPOLAÇÃO



FONTE: O autor

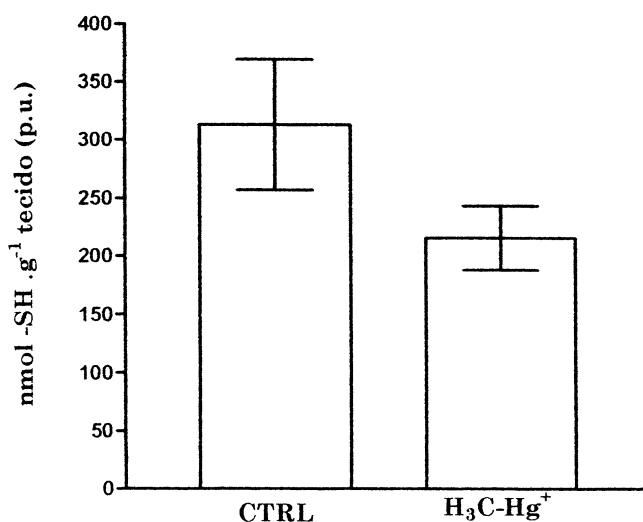
NOTAS: Concentrações finais de glutatona ([GSH]) diluída em EDTA a 2 mM e HCl 0,5 N.

O fotômetro considera o padrão de [GSH] = 0 como branco.

O volume final de leitura foi de 300 μl.

$Y = (0,8071).X - 2,925$; $r^2 = 0,9876$

GRÁFICO 7 – TEORES TECIDUAIS DE SULFIDRILA (nmol de -SH) POR UNIDADE DE MASSA DA AMOSTRA DE BRÂNQUIA (g) DE *HOPLIAS MALABARICUS* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A 75 ng H_3C-Hg^+ .g⁻¹ DE BIOMASSA, POR 70 DIAS (14 DOSES)



FONTE: O autor

NOTAS: n = 8 animais por grupo.

II.4 DISCUSSÃO

O método utilizado por VIARENGO et al. (1997), é um método indireto, pois quantifica sulfidrilas ($-SH$) da amostra e não a quantidade absoluta de MTs. Contudo os pesquisadores ressaltam que o método se mostra eficaz quando da comparação entre grupos experimentais, na tentativa de discriminação da situação controle, daquela dos tratamentos ou exposições. Fundamentam que pelo fato de a MT ser rica em cisteínas (e portanto em sulfidrilas), uma alteração na sua expressão em certos tecidos pode ser detectada. De fato, no programa de biomonitoramento da costa do Mediterrâneo (MED POL), VIARENGO et al. (2000) promoveram uma adaptação (simplificação) e a validação do método empregado em 1997, demonstrando que oito laboratórios que dispuseram do método para as mesmas amostras, puderam diferenciar de forma eficaz os grupos controles dos tratados.

O método proposto por VIARENGO et al. (1997) foi utilizado por CAMPANA, SARASQUETE e BLASCO (2003) para a MT de *Halobatrachus didactylus*, nos quais houve a indução da síntese de MT em fígado, sete dias após a injeção única (dose intraperitoneal) de $1 \text{ ng Pb}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa. A indução não foi considerada uma resposta imediata do organismo, mas sim dependente do acúmulo do metal no fígado. Para os teores “normais” de MT hepática (situação controle) eles relatam valores de $\approx 4\text{--}11 \text{ mmol MT} \cdot \text{g}^{-1} \text{ tecido (p. u.)}$, com alta variação durante os 7 dias de exposição. Supondo segundo os próprios autores, uma relação de $1 \text{ mmol MT} = 20 \text{ mmol GSH}$, seus resultados equivaleriam aqui a uma variação de $\approx 80.000\text{--}220.000 \text{ } \mu\text{mol } -SH \cdot \text{g}^{-1} \text{ tecido}$, valores muito superiores ao aqui relatado para o fígado (média de $0,265 \text{ } \mu\text{mol } -SH \cdot \text{g}^{-1} \text{ tecido}$), dos controles de *Hoplias malabaricus*.

De outra forma, utilizando *Mullus barbatus* como espécie bioindicadora num estudo no mar da Ligúria (ao N da Córsega), REGOLI et al. (2002), empregando o método de VIARENGO et al. (1997) relatam valores de MT hepática próximos ao aqui encontrado ($\approx 600 \text{ nmol } -SH \cdot \text{g}^{-1} \text{ tecido}$). Ao identificar variações não significativas, quando esses valores foram comparados em quatro

áreas amostradas durante 1998–2000, os pesquisadores sugerem que isso reflete uma baixa indução da MT hepática como resposta biológica em condições de campo, onde variações naturais podem minimizar o efeito de contaminantes ambientais para esse parâmetro.

De fato, segundo TOM et al. (1999), a quantidade de RNA_m da MT hepática de *Lithognathus mormyrus* sofre alterações de acordo com a temperatura da água e com flutuações nas concentrações de metal em águas impactadas, também no mediterrâneo.

Assim comparações entre teores de MTs tecidual entre espécies diferentes, ou até entre populações alopátricas da mesma espécie, devem ser precedidas de estudos que demonstrem a indução da expressão das MTs, frente a diferentes condições do meio, sejam elas controladas experimentalmente em laboratório, ou condições ambientais *in loco*. Neste caso, um histórico que leve em conta as variações sazonais de parâmetros físico-químicos do meio deve ser reportado. Contudo, métodos diferentes empregados na quantificação das MTs podem levar a uma incongruência na comparação de resultados obtidos. Considera-se aqui este fato como um interveniente discutido a seguir.

ERK et al. (2002), fazendo uma comparação entre vários métodos de purificação da MT, concluiu que o método proposto por VIARENGO et al. (1997), dispondo de etanol e clorofórmio como solventes, causa uma redução drástica na quantidade de uma das isoformas da MT de *Mytilus galloprovincialis*, quando comparado a outros métodos, o que interfere na quantificação da MT por método eletroquímico.

Duas frações distintas de sobrenadante do homogenato tecidual foram utilizadas por VIARENGO et al. (1997) para a purificação com os solventes: uma obtida a 100.000×g, correspondente à fração citosólica (coeficiente de sedimentação de 50 S na ultracentrífuga) e outra obtida 30.000×g. Esta última serviu para a apresentação dos resultados pelos autores que, embora não demonstrem, afirmam que a fração 50 S “pode ser usada alternativamente sem diferenças significativas nos resultados”.

A centrifugação aqui utilizada ($21.460\times g$, 30 min., 4°C) esteve restrita ao equipamento disponível e eliminou do sobrenadante as mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos. Contudo, no sobrenadante de homogenatos teciduais nessas condições, microssomos e outras pequenas vesículas permanecem. No caso do fígado, a maior parte dessas vesículas é oriunda do retículo endoplasmático liso. O conteúdo desses compartimentos subcelulares pode ter alterado a resposta aqui obtida, já que o interior de vesículas é distinto do citosol, onde um ambiente redutor mantém a condição reduzida das sulfidrilas ($-\text{SH}$). Além disso, uma distribuição não uniforme da expressão das MTs ao longo do fígado (fusiforme em muitos peixes) pode gerar resultados com grande coeficiente de variação. Sugere-se a utilização do órgão inteiro, o que é fácil para pequenos peixes, mas não foi possível para *Hoplias malabaricus*. No presente trabalho, o método de VIARENGO et al. (1997) modificado não possibilitou a discriminação dos animais tratados, dos controles. Um ou mais dos intervenientes abaixo relacionados podem ter sido a causa:

- a) VIARENGO et al. (1997) se utilizam de tecidos de moluscos (brânquias e glândulas digestivas) e aqui foram usados brânquias e fígado de peixes;
- b) uma ou mais das modificações descritas em II.2.2 podem ter gerado valores superestimados ou subestimados;
- c) o método é indireto, pois quantifica $-\text{SH}$, e não a molécula de MT; deve-se considerar que outras moléculas que possuam $-\text{SH}$ podem produzir resultados superestimados.

As amostras de brânquias de *Hoplias malabaricus* apresentaram maiores valores de quantidade de $-\text{SH}$ tecidual na situação controle ($313,23 \text{ nmol } -\text{SH} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido, p.u.), do que as de fígado-controle ($265,55 \text{ nmol } -\text{SH} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido, p.u.). A menor densidade desse tecido em relação àquele não foi a razão, já que a massa final foi corrigida pela densidade do tecido, e assume-se que realmente as brânquias de *Hoplias malabaricus* possuem mais grupos $-\text{SH}$ do que o fígado.

CAPÍTULO III

ESTUDOS COM A VITELOGENINA DE TRAÍRA (*HOPLIAS MALABARICUS*)

COLABORAÇÃO :

Francisco Filipak Neto, M.Sc.

Prof. M.Sc. Marco Antonio Ferreira Randi

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis

Publicação em Preparação:

ALVES COSTA, J .R. M.; FILIPAK NETO, F.; SILVA DE ASSIS, H. C.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenic index for *in vitro* vitellogenin production by fish hepatocytes as biomarker screening method for determining (anti)estrogenic effects of xenobiotics. Para submissão na *General and Comparative Endocrinology*.

III.1 INTRODUÇÃO

III.1.1 EXPRESSÃO DA VTG COMO BIOMARCADOR MOLECULAR

A vitelogenina (VTG) é uma glico-fosfo-lipoproteína de alta massa molecular (de 170 a 200 kDa, dependendo da espécie) sintetizada em hepatócitos sob controle multi-hormonal: a transcrição de seu RNA_m é ativada por estrógenos, principalmente o 17 β -estradiol (E₂). A VTG é o principal constituinte do vitelo de vertebrados ovíparos e é liberada no sangue ou no meio de cultivo *in vitro* por exocitose dos hepatócitos. A síntese de VTG é essencial para a continuidade física da população natural de uma dada espécie ovípara. Para uma abordagem mais ampla acerca da produção de VTG, relacionada a outros biomarcadores e ao sistema neuro-endócrino de peixes (ver fig. 1, seção 4).

A literatura científica é extensa, quando está relacionada a estudos com a VTG de vertebrados, e principalmente com a expressão da VTG de peixes, esta utilizada como resposta biológica para exposição a substâncias que são desreguladoras endócrinas. De fato, na última década a expressão da VTG por hepatócitos, ou a supressão da mesma, têm sido amplamente empregadas em várias espécies de peixes como indicadores de efeitos estrogênicos em machos e jovens, ou anti-estrogênicos em fêmeas. Alguns relatos com o uso da expressão da VTG de peixes como resposta biomarcadora, *in vivo* ou *in vitro* (cultivo primário de hepatócitos), podem ser encontrados em PELISSERO et al. (1993); LAZIER et al. (1996); MUGIYA e TANAHASHI (1998); MOSCONI et al. (1998); KIME (1999); SMEETS et al. (1999); MELLANEN et al. (1999); HWANG, NAGAWA e MUGIYA (2000); KORDES, RIEBER e GUTZEIT (2002); LATONNELLE et al. (2002); OOST, BEYER e VERMEULEN (2003); RADICE et al. (2004); SPANÒ et al. (2004); ZHONG et al. (2005).

A seqüência de aminoácidos (*aa*) da VTG de peixes e de outros vertebrados é considerada bem conservada entre distintas categorias taxonômicas e no decorrer do tempo evolutivo. Treze seqüências completas de *aa* da VTG de 7 espécies de peixes (em algumas espécies há duas isoformas de VTG seqüenciadas)

foram escolhidas entre 27 seqüências de *aa* da VTG de TELEOSTEI, encontradas *on line* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2006).

Dispondo dos programas BioEdit v.5.0.9 (HALL, 2001) e ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) as 13 seqüências encontradas foram alinhadas em consenso, demonstrando uma média de 56,8% de similaridade, duas a duas. Tais seqüências demonstraram um número médio de 1713 *aa* (desvio padrão de 50 *aa*), correspondentes a uma massa molecular média de 187,95 kDa (desvio padrão de 5,15 kDa).

Essas características determinam uma grande probabilidade de que as distintas seqüências polipeptídicas de VTG, encontradas em diferentes espécies de teleósteos, possuam epitopos similares, quando da imunização de animais com a VTG antigênica (imunógeno) para produção de anticorpos policlonais contra a VTG de peixes. De fato, PETERS et al. (2001) e MONCAUT, NOSTRO e MAGGESE (2003) realizaram estudos que levam em conta o princípio da imunoreação cruzada para a detecção e quantificação da VTG de peixes.

Vários métodos já foram desenvolvidos para a quantificação (absoluta ou relativa) da VTG de peixes, e tais métodos foram utilizados após a exposição desses animais a substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas. Aqui optou-se pela produção de anticorpos policlonais contra a VTG de *Hoplias malabaricus*, bem como pela aquisição de anticorpos policlonais comercialmente disponíveis (Laboratórios Biosense®, Noruega) contra a VTG de outras espécies de peixes. Também foi realizado um estudo da indução (*in vivo* e *in vitro*) da expressão da VTG de *Hoplias malabaricus* por agentes químicos com reconhecida ação estrogênica, e anti-estrogênica. Em adição, os efeitos do Pb^{++} sobre a produção da proteína *in vivo* foram investigados.

A próxima seção trata de considerações teóricas que visam implementar, através do emprego de modelos matemáticos, os métodos de quantificação já existentes para VTG, em relação ao tamanho da amostra e ao “ambiente” ou condição laboratorial (tratamento) a partir da qual ela pôde ser obtida.

III.1.2 ÍNDICE VITELOGÊNICO

Índice vitelogênico (I_{VTG}) é uma concepção teórica que considera, numa unidade de tempo e numa unidade de espaço pré-estabelecidos, a produção de VTG como uma resposta biológica frente a condições extrínsecas à unidade de produção (tratamento experimental ou condições ambientais), bem como relaciona tal resposta com a magnitude própria (tamanho da amostra) do conjunto (classe) determinado parcialmente pelas condições extrínsecas supracitadas. Assim, o I_{VTG} pode comparar o “quanto” de VTG está sendo produzida (ou expressa, dependendo do método de quantificação) em um grupo de organismos (populações amostradas em campo), ou em um grupo experimental (organismos ou tecidos tratados em laboratório). Como o I_{VTG} pode ser empregado em dois níveis de organização biológica distintos, a saber, “tecidual” (para ensaios *in vitro* com cultivo primário de hepatócitos) e “populacional” (com grupos de indivíduos amostrados em campo, ou grupos experimentais para bioensaios), quatro interpretações do modelo, ou equações distintas, são aqui apresentadas.

Ressalta-se que todo o mérito intelectual para a concepção original do modelo matemático encontra-se no “Índice de Atividade Reprodutiva” (IAR), proposto por AGOSTINHO et al. (1991), que é um modelo ecológico de nível populacional. Aqui, pretende-se apenas quatro novas interpretações e possíveis aplicações para o modelo. Sendo assim apresenta-se portanto, antes do I_{VTG} , a equação do IAR que lhe deu origem:

$$IAR = \frac{\ln N_i \times [(\frac{n_i}{\sum n_i}) + (\frac{n_i}{N_i})] \times (RGS_i \div RGS_e)}{\ln N_m \times [(\frac{n_m}{\sum n_i}) + 1]} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

- a) N_i : número de indivíduos na unidade amostral considerada (um valor por área amostrada);
- b) n_i : números de indivíduos em reprodução nas unidades amostrais consideradas (um valor por área amostrada);
- c) N_m : número de indivíduos da **maior unidade amostral**;

- d) n_m : número de indivíduos em reprodução na **maior unidade amostral**;
- e) $RGS = (\text{massa das gônadas} \times 100) \div \text{massa total do animal}$;
- f) RGS_i : RGS média dos indivíduos em reprodução na unidade amostral “i” ;
- g) RGS_e : maior valor individual de RGS.

O IAR é um modelo que permite a interpretação quantitativa do “panorama reprodutivo” de uma população de peixes fêmeas, amostrada em seu ambiente natural. O IAR considera o “tamanho” da população de fêmeas em questão (há um valor de IAR para cada população amostrada), em relação ao “tamanho” da população de referência, esta sendo a maior população da análise, da qual se pressupõe a “máxima” atividade reprodutiva, expressa pela unidade ($n_m \div N_m = 1$) no denominador da equação (7). Uma amostragem padronizada, com referencial de esforço de captura (geralmente m^2 de rede de pesca por unidade de tempo) é imprescindível para a comparação dos valores de IAR obtidos no tempo e no espaço. Machos são excluídos da análise, já que seu valor numérico de relação gônado-somática ($RGS \approx 1$) não contribui para o índice.

Da equação (7), para o estabelecimento do I_{VTG} nas quatro interpretações que seguem, a alteração comum é a substituição do valor biométrico individual (RGS) pela quantificação da VTG em amostras biológicas. Esta quantificação pode revelar valores próximos ao absoluto, com emprego de imunoensaios (pós-transcricional); bem como demonstrar a condição pré-transcricional da expressão de VTG (pela quantificação de seu RNA_m); ou ainda quando relativa (métodos indiretos) servir estritamente à comparação de grupos experimentais.

III.1.2.1 I_{VTG} para Populações Naturais

Aqui, o I_{VTG} tem interpretação similar a do emprego do IAR, podendo ser concebido segundo a seguinte equação:

$$I_{VTG} = \frac{\ln N \times [(\mathbf{n} \div \sum \mathbf{n}) + (\mathbf{n} \div N)] \times (VTG \div VTG_{max})}{\ln N_{max} \times [(\mathbf{n}_{max} \div \sum \mathbf{n}) + 1]} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

- a) **N** : número de indivíduos na unidade amostral considerada (N de cada grupo);
- b) **n** : número de indivíduos que expressam vitelogenina (VTG[+]) na unidade amostral considerada;
- c) **N_{max}** : número de indivíduos na maior unidade amostral;
- d) **n_{max}** : número de indivíduos VTG[+] na maior unidade amostral;
- e) **VTG** : quantidade média de VTG na unidade amostral considerada;
- f) **VTG_{max}** : maior valor individual de VTG.

Ressalta-se que a equação tem entrada binária, ou seja: com vitelogenina (VTG[+]), ou sem vitelogenina (VTG[-]), esta geralmente quantificada no plasma. Uma produção constitutiva de VTG, detectável pelo método de quantificação, em machos ou animais jovens sexualmente imaturos, igualaria os valores de $n = N$ e de $n_{max} = N_{max}$.

Portanto o I_{VTG} representa a produção molecular de VTG em populações naturais (há um valor de I_{VTG} para cada população amostrada), em relação à quantidade de indivíduos que expressam VTG ($\sum n$), e em relação aos “tamanhos” (N e N_{max}) das amostras analisada e de referência (denominador), esta última sendo a maior amostra da análise, da qual se pressupõe a “máxima” atividade reprodutiva, expressa pela unidade ($n_{max} \div N_{max} = 1$) no denominador da equação (8). Pode-se considerar diferentes áreas amostradas em campo, desde que uma amostragem padronizada (com referencial de esforço de captura) seja empregada para a comparação dos valores de I_{VTG} obtidos no tempo e no espaço.

A VTG é uma proteína expressa sob ação hormonal por hepatócitos de fêmeas em idade reprodutiva, principalmente durante os estágios de vitelogênese e maturação dos oócitos, quando ela é incorporada nessas células. Contudo sabe-

se que peixes machos podem expressar a VTG, quando expostos a substâncias com ação estrogênica.

Somado a isso tem-se que o tema “peixes”, como categoria taxonômica é um grupo filogeneticamente “não natural” (sem ascendência única comum) que apresenta todos os tipos de “estratégias” reprodutivas encontradas em vertebrados. Há pelo menos uma espécie amazonense que apresenta partenogênese ou ginogênese (*Poecilia formosa*); há todos os tipos de hermafroditismo (espécies monóicas): o simultâneo (com autofecundação ou fecundação cruzada), o seqüencial (ou sucessivo) com alternância seqüencial (reversão sexual completa) apresentando casos de protandria ou protoginia; há espécies gonocorísticas (dióicas), com ou sem dimorfismo sexual (que em peixes seria melhor denominado como mais um tipo de polimorfismo populacional); e há casos de populações onde ocorre a diandria: machos e fêmeas gonocorísticos e fêmeas com hermafroditismo seqüencial que dão origem a machos secundários (protoginia).

Frente a esse quadro, o emprego do I_{VTG} teria a vantagem, em relação ao IAR, de não estar restrito a espécies gonocorísticas (dióicas) e de fazer integrar a população de machos (em casos de dioicia) na análise. Além disso o I_{VTG} seria útil em estudos onde se busca saber qual a “condição reprodutiva” de uma população, frente a ambientes impactados por substâncias que alterem o sistemas neuro-endócrino e reprodutivo integrados dos indivíduos. Tem assim uma ampla utilidade na área da ecologia aplicada, como biomarcador para a “detecção de substâncias desreguladoras endócrinas”, relacionando respostas biológicas individuais (produção de VTG em cada organismo) com o tamanho da amostra e padronizando a comparação de grupos experimentais amostrados em diferentes áreas de estudo (biomonitoramentos).

Dessa forma o I_{VTG} reflete variáveis intervenientes no fluxo de energia e matéria de um ecossistema, pois está relacionado com a fecundidade e, por conseguinte, com a “tabela de vida” de uma população considerada. Contudo o modelo atribui uma propriedade mensurável (“condição reprodutiva”) a uma população, a partir de um nível inferior de organização biológica (indivíduos

isolados). Essa ascendência de nível organizacional (BUNGE, 1980), correspondente ao aumento de complexidade do nível individual (conjunto de organismos) para o populacional (conjunto de populações ou amostras) deve ser validada com a demonstração empírica, o que torne exeqüível o emprego do I_{VTG} .

III.1.2.2 I_{VTG} para a Vitelogênese, com Fêmeas como Controle Referencial (I_{VTGf})

Aqui, o I_{VTGf} tem interpretação similar a do emprego do I_{VTG} para populações naturais, explanado na seção anterior (IV.1.2.1). Contudo não pode ser utilizado para espécies de peixes que apresentem hermafroditismo simultâneo, ou seja, espécies monóicas que apresentem os dois sexos no mesmo estágio de desenvolvimento. Isso porque o grupo de referência (denominador) é composto por fêmeas (estando ou não em idade reprodutiva) que servem como um grupo controle para a vitelogênese considerada “normal” para uma espécie. O I_{VTGf} pode ser concebido segundo a seguinte equação:

$$I_{VTGf} = \frac{\ln N}{\ln N_f} \times \frac{[(n \div \sum n) + (n \div N)]}{[(n_f \div \sum n) + (n_f \div N_f)]} \times \frac{VTG}{VTG_{max}} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

- a) **N** : número de indivíduos na unidade amostral considerada (N de cada grupo);
- b) **n** : número de indivíduos que expressam vitelogenina (VTG[+]) na unidade amostral considerada;
- c) **N_f** : número de indivíduos do grupo controle (fêmeas);
- d) **n_f** : número de fêmeas controles em reprodução, com VTG[+];
- e) **VTG** : quantidade média de VTG na unidade amostral considerada;
- f) **VTG_{max}** : maior valor individual de VTG.

Machos e fêmeas integram o I_{VTGf} , contudo são analisados em separado (há um valor de I_{VTGf} para cada sexo, de cada uma das populações amostradas). Portanto o I_{VTGf} representa a produção molecular de VTG em populações naturais,

em relação à quantidade de indivíduos que expressam VTG (Σn), e em relação aos “tamanhos” (N e N_f) das amostras analisada e de referência (controle de fêmeas no denominador), esta última sendo a amostra correspondente à condição natural de vitelogênese, da qual não se pressupõe a “máxima” atividade reprodutiva: $n_f \div N_f \leq 1$, pois em condições naturais $n_f \leq N_f$.

Pode-se considerar diferentes áreas amostradas em campo, desde que uma amostragem padronizada (com referencial de esforço de captura) seja empregada para a comparação dos valores de I_{VTGf} obtidos no tempo e no espaço.

O I_{VTGf} serve para a identificação de:

- a)** efeitos estrogênicos em fêmeas induzidas por xenoestrógenos ($I_x > I_f$);
- b)** efeitos anti-estrogênicos em fêmeas maduras ($I_x < I_f$);
- c)** efeitos estrogênicos em grupos de machos ou jovens imaturos, dos quais qualquer valor possível de I_{VTGf} indica produção de VTG e portanto, estrogenicidade.

Portanto o I_{VTGf} pode ser usado como biomarcador para a “detecção de substâncias desreguladoras endócrinas”, relacionando respostas biológicas individuais (produção de VTG em cada organismo) com o tamanho da amostra e com a condição normal de vitelogênese, padronizando assim a comparação de grupos amostrados em diferentes áreas de estudo (biomonitoramentos). É também indicado para estudos sazonais da reprodução de espécies de peixes.

Uma variante do uso da equação (9) seria seu emprego em condições experimentais controladas (bioensaios), onde o grupo de referência (controle) seria composto somente por fêmeas maduras, em reprodução (vitelogênese). Neste caso:

- a)** o modelo pressupõe uma “alta” atividade reprodutiva para o grupo de referência: $n_f \div N_f \cong 1$ ($n_f \cong N_f$);
- b)** para bioensaios, com algumas exceções, geralmente se trabalha com grupos reduzidos, em relação às amostragens de campo; nesse caso a transformação logarítmica ($\ln N$ e $\ln N_f$) é prescindível;

- c) o ideal para bioensaios é se trabalhar com grupos experimentais com o mesmo tamanho, daí que $N = N_f$, podendo-se suprimir da equação (9) o fator $\ln N \div \ln N_f = 1$.

III.1.2.3 I_{VTGe} para Bioensaios de Indução Experimental da VTG (I_{VTGe})

Ensaios *in vivo* com a indução experimental da expressão de VTG, por meio de uma substância com reconhecida ação estrogênica, servem como referência a testes posteriores, para os potenciais (anti)estrogênicos de outras substâncias, ou seja, estrogênicos em machos e jovens, ou anti-estrogênicos em fêmeas. Usualmente se utiliza o 17β -E₂ ou uma molécula derivada. Além disso, para o estabelecimento de uma resposta biológica como biomarcadora, que possa ser utilizada em monitoramentos ambientais, ela deve ser previamente demonstrada com bioensaios e estudos *in vitro* que dispõem da espécie em questão.

O I_{VTGe} pode complementar o entendimento de parâmetros clássicos de farmacocinética, que indicam sensibilidade do organismo a uma substância exógena (como EC₅₀, ou ED₅₀) ou a potência dessa substância (LOEC, LOED, EC₁₀, ou ED₁₀). O I_{VTGe} pode ser concebido segundo a seguinte equação:

$$I_{VTGe} = \frac{[(n \div \sum n) + (n \div N)]}{[(N_{E2} \div \sum n) + 1]} \times \frac{VTG}{VTG_{max}} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

- a) **N** : número de indivíduos na unidade amostral considerada (N do grupo ou tratamento);
- b) **n** : número de indivíduos que expressam vitelogenina (VTG[+]) na unidade amostral considerada (um valor por tratamento);
- c) **N_{E2}** : número de indivíduos no grupo controle induzido (E₂[+]);
- d) **n_{E2}** : número de indivíduos VTG[+] do grupo E₂[+]; **N_{E2} = n_{E2}**
- g) **VTG** : quantidade média de VTG no grupo ou tratamento;
- e) **VTG_{max}** : maior valor individual de VTG.

Ressalta-se que $N_{E2} = n_{E2}$, por isso n_{E2} não figura na equação (10), em comparação com as equações (8) e (9); a igualdade dá-se pelo fato de todos os animais induzidos apresentarem VTG expressa. O modelo considera a “máxima” atividade reprodutiva do grupo induzido, situação que neste caso não é arbitrária como nas equações (7), (8) e (9). Isso está expresso pela unidade ($n_{E2} \div N_{E2} = 1$) no denominador da equação (10).

O principal emprego do I_{VTGe} seria para a descoberta de substâncias com ação anti-estrogênica (bioensaios com administração concomitante do E_2) que possam comprometer a reprodução de uma espécie considerada. O I_{VTGe} representa a produção molecular de VTG em grupos controlados (bioensaios), onde a resposta biológica individual (produção de VTG em cada organismo) está relacionada com a quantidade de indivíduos que expressam VTG ($\sum n$), e com os “tamanhos” (N e N_{E2}) das amostras analisada e de referência (controle induzido no denominador). Permite assim padronizar a comparação de grupos controlados em condições laboratoriais, ou *in loco* (bioensaios *in situ*). Há um valor de I_{VTGe} para cada tratamento experimental.

Contudo ressalta-se que o I_{VTGe} somente se faz útil para bioensaios com espécies gonocorísticas (dióicas) que apresentem dimorfismo sexual, ou que permitam de alguma forma a diferenciação entre os sexos, pois deve-se atribuir dois valores de I_{VTGe} para cada tratamento, um para cada sexo. Caso contrário, se a composição dos grupos não for de 50% machos e 50% fêmeas, o índice não irá representar uma situação real de ação (anti)estrogênica.

III.1.2.4 I_{VTG} para Ensaios *in vitro* de Estrogenicidade (I_{VTGh})

Ensaios *in vitro* de estrogenicidade induzida, com a expressão de VTG como resposta (efeito), geralmente empregam o cultivo primário de hepatócitos e dispõem da exposição das células a substâncias como o E_2 ou o 17α -etinil-estradiol (EE_2). Eles servem como referência para testes posteriores, dos potenciais (anti)estrogênicos de outras substâncias. Além disso, para o estabelecimento de uma resposta biológica como biomarcadora, que possa ser

utilizada em monitoramentos ambientais, deve-se conhecer previamente aspectos e parâmetros que indiquem a sensibilidade de um tipo celular às substâncias exógenas (EC₅₀) ou a potência dessas substâncias (LOEC, ou EC₁₀). O I_{VTGh} pode ser concebido segundo a seguinte equação:

$$I_{VTGh} = \frac{\ln n}{\ln N_{E2}} \times \frac{[(n \div \sum n) + 1]}{[(N_{E2} \div \sum n) + 1]} \times \frac{(VTG - VTG_C)}{VTG_{max}} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

- a) **n** : número médio de células viáveis por unidade de cultivo (poço de microplaca, lamínula ou garrafa) no tratamento considerado;
- b) **N_{E2}** : número médio de células viáveis por unidade de cultivo no grupo induzido (E₂[+]);
- c) **VTG** : concentração ou quantidade de VTG aferida nas unidades de cultivo do tratamento considerado;
- d) **VTG_C** : VTG aferida nas unidades de cultivo do **grupo controle**, sem nenhum tratamento;
- e) **VTG_{max}** : maior valor individual de VTG.

Ressalta-se que $N_{E2} = n_{E2}$ e que $N = n$, por isso n_{E2} e N não figuram na equação (11). Essas igualdades dão-se pelo fato de que o modelo pressupõe que a expressão de VTG ocorre em todos os grupos ou tratamentos experimentais, mesmo que seja uma produção basal do grupo controle, sem nenhum tratamento (expressão constitutiva). Isso está expresso pelas unidades ($n_{E2} \div N_{E2} = 1$ e $n \div N = 1$) no denominador e no numerador da equação (11).

O principal emprego do I_{VTGh} seria para a descoberta de substâncias com ação anti-estrogênica (ensaio com administração concomitante do E₂). O I_{VTGh} representa a produção molecular de VTG por tratamento *in vitro*, onde a resposta é a ação (anti)estrogênica e está relacionada com a quantidade de células que expressam VTG ($\sum n$) em cada unidade de cultivo e com os “tamanhos” (n e N_{E2}) das amostras analisada (tratamento) e de referência (controle induzido no

denominador). Permite assim padronizar a comparação de grupos controlados em condições laboratoriais.

Usualmente em estudos de estrogenicidade utiliza-se também uma substância antagonista ao efeito estrogênico, como por exemplo, o citrato de tamoxifeno (TMX). Métodos de citometria e aferição da viabilidade das células em cultivo são utilizados na contagem de células, para que se possa dispor da equação (11) na determinação do I_{VTGh} relativo a cada tratamento. Estes, para o teste da ação estrogênica de um xenobiótico (X), devem compor os seguintes grupos sugeridos:

- a)** grupo controle: sem nenhum tratamento;
- b)** grupo controle do solvente (veículo) dos tratamentos (geralmente etanol ou DMSO);
- c)** E_2 : grupo induzido;
- d)** TMX: grupo controle de citotoxicidade ao TMX;
- e)** E_2 +TMX: grupo controle de ação anti-estrogênica;
- f)** X: grupo controle de citotoxicidade à X;
- g)** E_2 +X: grupo teste de (anti)estrogenicidade de X;
- h)** X+TMX: grupo teste de citotoxicidade (sinergismo).

Ensaio-piloto devem estabelecer uma curva da resposta (VTG produzida) em função do tempo de exposição ao indutor estrogênico e outra, da resposta em função da concentração do indutor. Sugere-se a utilização da EC_{50} do indutor para determinação do I_{VTGh} de cada substância testada.

III.1.2.5 Considerações Gerais dos Índices

Foi dito ao final da seção IV.1.2.1 que o emprego da equação (8) deve ser validado com a demonstração empírica. Isso também deve ocorrer para as equações (9) e (10), principalmente devido ao fato de tais modelos matemáticos atribuírem a populações um valor numérico (índice), correspondente a propriedades inerentes a indivíduos, tais como: “atividade reprodutiva”, “condição reprodutiva”, “efeito estrogênico”, “efeito anti-estrogênico”. Essas propriedades

podem seguramente ser atribuídas a indivíduos (organismos), mas o são, com emprego do I_{VTG} , para populações ou grupos de estudo. Contudo deve-se considerar a ascendência de nível organizacional biológico, este concebido como um conjunto (classe matemática) por BUNGE (1980); ascendência essa que corresponde ao aumento de complexidade do nível individual (concebido como o conjunto de todos os organismos possíveis) para o populacional (concebido como o conjunto de populações ou amostras experimentais possíveis). Portanto a atribuição de propriedades mensuráveis de um nível para outro imediatamente superior deve sofrer validação lógica e empírica, para que o emprego das equações supracitadas represente uma relação de causa-efeito com conexão universal, podendo então compor o corpo de uma teoria científica, enunciando fenômenos naturais.

No caso da equação (11) para o I_{VTGh} , pode-se prescindir da validação lógica, mas não da empírica. Isso porque com ela, trabalha-se num mesmo nível organizacional, manipulado e controlado: o conjunto de células em cultivo. Portanto não há a atribuição de uma propriedade de um nível, para outro imediatamente superior. Haveria se fosse possível aferir a quantidade de VTG produzida por cada célula em cultivo.

Pretende-se aqui a demonstração empírica da equação (11), com o cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* e com a indução experimental da expressão de VTG *in vitro*.

III.2 MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1 PRODUÇÃO DA VTG *IN VIVO* POR INDUÇÃO ESTROGÊNICA

III.2.1.1 Bioensaio

Três exemplares de *Hoplias malabaricus* (traíra) foram obtidos comercialmente de uma estação de aquicultura em Toledo (PR). Os animais foram aclimatados nas condições experimentais por 4 meses: cada animal em um aquário com 15 litros de água de torneira desclorificada; limpeza do aquário a cada 7 dias, com troca de 5 litros da água; influxo de ar constante; temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$; e fotoperíodo (12h luz : 12h escuro). Essas condições foram mantidas e controladas até o fim do experimento. O suprimento alimentar deu-se com minhocas (para as traíras menores: 25,8 e 26,1 g) ou *Astyanax* sp. (lambaris), para a traíra maior (494,3 g). Cada traíra foi alimentada com aproximadamente 10% de sua biomassa, a cada 5 dias. Durante a indução (15 dias) os animais permaneceram em jejum experimental.

Após anestesia em água de torneira desclorificada com MS222 (ácido etil-éster-3-aminobenzóico, Sigma®) a 0,02% (v/v), a traíra maior (macho adulto) teve sua massa aferida e recebeu uma dose de 20 mg.kg^{-1} de hexa-hidrobenzoato de estradiol (6HB-E₂), diluído em óleo de amendoim e administrado por via intraperitoneal (iip). Após 15 dias, a traíra maior e as outras duas (macho e fêmea jovens) foram anestesiadas como descrito acima e $\approx 0,5$ ml de sangue (de cada traíra menor) e ≈ 4 ml de sangue (traíra maior) foram extraídos do vaso caudal situado na porção ventral da coluna vertebral, com seringas heparinizadas.

Conforme procedimento descrito por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993), ao sangue total foi acrescentado na razão 1:10 (v/v), o anti-proteolítico PMSF a 10 mM em NaCl a 0,9%, resultando nas concentrações finais de: PMSF a 1 mM e etanol a 0,5% (da solução estoque de PMSF a 200 mM em etanol absolto). A mistura foi centrifugadas a 4°C , sob a força de $3000\times g$ por 30 minutos para

obtenção do plasma, que foi aliquoteado, sujeito imediatamente ao procedimento descrito a seguir, ou mantido a -75°C até análises posteriores.

III.2.1.2 Isolamento da VTG Plasmática por Precipitação

Segundo método descrito por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) a VTG foi isolada do plasma numa purificação parcial através da precipitação com solução de EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e MgCl_2 . Amostras do precipitado protéico (do plasma do animal induzido) foram obtidas a partir de 4 razões molares entre EDTA^- e Mg^{++} , a saber:

- a) $[\text{EDTA}^-] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 2,5$
- b) $[\text{EDTA}^-] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 2,0$
- c) $[\text{EDTA}^-] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,5$
- d) $[\text{EDTA}^-] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,0$

Após a mistura do plasma com diferentes volumes das soluções estoques de EDTA a 20 mM e MgCl_2 a 500 mM, em microtubos de 1,5 ml, estes foram centrifugados a 4°C , sob a força de $5000 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 50 μl de NaCl a 1 M. Em cada tubo foram adicionados 1 ml de H_2O destilada para nova precipitação, esta seguida de centrifugação a 4°C , sob a força de $5000 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 50 μl de NaCl a 1 M.

O apêndice 2 compila numa planilha todos os procedimentos do método empregado, bem como as concentrações e volumes utilizados no isolamento.

Amostras de plasma dos três animais e da vitelogenina precipitada do animal induzido (VTGp) foram analisadas após eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (doravante abreviado por *SDS-PAGE*) a 4% (empilhamento) e a 9% (separação), com aplicação de campo elétrico vertical segundo LAEMMLI (1970), seguida de coloração com *Coomassie Brilliant Blue* (doravante abreviado por *CBB*). O procedimento foi repetido com volumes maiores de plasma estocado (ver III.2.1.1) com a razão molar de 1:2 ($[\text{EDTA}^-] \div [\text{Mg}^{++}]$), para obtenção de VTGp (imunógeno) utilizado em III.2.2.1 (ver linha 6 da figura 6).

III.2.2 ANTICORPOS POLICLONAIS PARA A IMUNO-DETECÇÃO

Foram adquiridos comercialmente (Laboratórios Biosense®, Oslo, Noruega) três tipos de anti-soro (anticorpos policlonais) contra a VTG de 3 diferentes espécies de peixes, a saber: *Salvelinus alpinus* (anti-soro doravante abreviado por SALP), *Sparus aurata* (SPAU) e *Salmo salar* (SALA). Todos os 3 tipos de anti-soro foram produzidos em coelhos pelo laboratório supracitado. Os anticorpos foram testados para constatação de reação imuno-química cruzada com a VTG de *Hoplias malabaricus*.

III.2.2.1 Produção de Anti-Soro contra VTG de *Hoplias malabaricus* (HOPL)

O plasma excedente (estocado a -75°C), das traíras induzidas como descrito em III.2.1.1 e adiante, em III.2.3 (controles de indução), serviu como fonte de VTG. Esta foi precipitada (VTGp) de acordo com o método de SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993), seguido da separação das proteínas da amostra de VTGp por sua massa molecular (*SDS-PAGE*) como descrito em III.2.1.2. As amostras de VTGp aplicadas ao gel de poliacrilamida tiveram seu teor protéico previamente quantificado pelo método de BRADFORD (1976) e serviram como imunógeno, após a maceração (grau e pistilo) da “banda” de gel congelada com N_2 líquido e correspondente a fração protéica de $\approx 180\text{--}200$ kDa (ver figura 6). A poliacrilamida serviu como adjuvante.

Dois coelhos da raça *New Zealand*, mantidos no biotério do SCB (UFPR), foram injetados, cada qual com cerca de 0,5 mg da VTGp, distribuídos por duas vias (mesma seringa para cada animal): intramuscular e subcutânea. Após 30 dias a mesma dose foi administrada como descrito acima. Depois disso, com intervalos alternados de 15 dias (HOLBECH et al., 2001), foram realizadas coletas de sangue a partir da veia marginal auricular, ou a administração de 0,25 mg de VTGp. Dez dias após a 4.^a inoculação os animais sofreram punção cardíaca, de acordo com procedimento de rotina do Biotério do SCB (UFPR).

O sangue obtido foi deixado a 4°C por 24 h e então centrifugado por 10 minutos a 3000×g para obtenção do anti-soro contra VTG de *Hoplias malabaricus*, este alíquotado e mantido a 4°C. O anti-soro obtido após a 4.^a inoculação (doravante abreviado por HOPL) serviu para a imuno-detecção da VTG de *Hoplias malabaricus*. Não houve diferença em especificidade da reação imuno-química obtida com HOPL proveniente dos dois coelhos.

III.2.2.2 Imuno-Detecção por *Western Blot*

Reações imuno-químicas entre os anti-soros SALP, SPAU, SALA ou HOPL, e a VTG de *Hoplias malabaricus* foram realizadas com amostras de plasma, meio de cultivo celular e células (hepatócitos) cultivados *in vitro*, após separação das proteínas dessas amostras por *SDS-PAGE*, seguida da transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®: poro de 0,45 µm), com aplicação de um campo elétrico ortogonal ao plano da membrana (1 h, 95 V, ≈ 200 mA, 0°C), na técnica conhecida como *Western Blot* (doravante abreviada por *WB*). Marcadores de massa molecular pré-corados em azul (BioRad®) foram empregados para o monitoramento da transferência. Foi utilizado para *SDS-PAGE* e *WB* o aparato *Mini Protean System* da BioRad®.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas do gel foram incubadas com os anti-soros supracitados e tratadas sob diferentes condições de “estringência” (ver resultados). Um *kit* de reagentes obtido comercialmente da BioRad® (*Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Assay Kit*) foi utilizado para a imuno-detecção. Esse *kit* dispõe da amplificação do sinal (cor púrpura) da fosfatase alcalina conjugada com a biotina, sendo esta incubada com a streptoavidina; o passo intermediário consiste da incubação com o anti-soro secundário (produzido em cabras contra a IgG de coelhos), que também tem suas moléculas de IgG conjugadas com a biotina.

Entre as incubações houveram três lavagens das membranas (sob forte agitação orbital), cada qual de 7–10 minutos com salina tamponada com Tris, pH 7,5 (TBS), contendo 0,1% (v/v) do detergente bioquímico Tween 20 (TTBS). O

TTBS serviu para a diluição dos componentes integrantes das incubações, no volume final de 0,5 ml.cm⁻² de membrana de nitrocelulose. Os policlonais primários foram adicionados sobre a solução de bloqueio membrana (leite em pó desnatado sem ferro a 5%, m/v, em TTBS), após o bloqueio de 1–2 horas (ocupação de sítios não específicos), à temperatura ambiente e com agitação orbital constante. As reações de cor da fosfatase alcalina, com a adição dos substratos, ocorreram sobre a bancada, a temperatura ambiente e no escuro, por tempos variados de acordo com a imuno-reatividade do policlonal primário empregado.

Variações do método proposto pelo fabricante do *kit* estão expressas nos resultados e o apêndice 3 compila numa planilha todos os procedimentos do método empregado para *SDS-PAGE-WB*, bem como as concentrações e volumes utilizados após padronização.

III.2.3 EFEITO DO CHUMBO SOBRE A EXPRESSÃO DA VTG *IN VIVO*

Dezoito exemplares jovens de *Hoplias malabaricus*, machos e fêmeas, foram obtidos comercialmente de um piscicultor de Araucária (PR). Os animais foram aclimatados nas condições experimentais por 4 meses, de acordo com III.2.1.1. Sua massa média foi de 80,84 g (DP = 34,67 g), somando 1616,83 g de biomassa total.

Foi realizado um bioensaio de exposição aguda (96 h) ao Pb(NO₃)₂, diluído em solução aquosa neutra e administrado por via intraperitoneal (iip), após 15 dias de indução da expressão da VTG com 17β-estradiol (E₂: C₁₈H₂₄O₂), este diluído em óleo de amendoim (após prévia diluição com etanol) e administrado por iip em 4 doses distintas. Seis triplicatas constituíram os grupos que seguem:

- a) controles:** iip de óleo de amendoim;
- b) controles de indução:** iip de 10 mg E₂.kg⁻¹;
- c)** iip de 7 µg Pb⁺⁺.g⁻¹ depois de 15 dias da iip 10 mg E₂.kg⁻¹;
- d)** iip de 21 µg Pb⁺⁺.g⁻¹ depois de 15 dias da iip 10 mg E₂.kg⁻¹;
- e)** iip de 63 µg Pb⁺⁺.g⁻¹ depois de 15 dias da iip 10 mg E₂.kg⁻¹;

f) iip de **100 $\mu\text{g Pb}^{++}.\text{g}^{-1}$** depois de 15 dias da iip 10 mg $\text{E}_2.\text{kg}^{-1}$;

As pesagens e injeções ocorreram após anestesia, como descrito em III.2.1.1, bem como a coleta de amostras de sangue e obtenção do plasma com anti-proteolítico PMSF.

As amostras de plasma dos animais foram analisadas por *SDS-PAGE* (empilhamento a 5% e separação a 7-9%), segundo LAEMMLI (1970), seguida de coloração com *CBB*, ou sujeitas a imuno-deteção da VTG por *WB*. Ver apêndice 3.

III.2.4 CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS E INDUÇÃO *IN VITRO*

III.2.4.1 Isolamento e Cultivo Primário de Hepatócitos

Dois exemplares de *Hoplias malabaricus* adultos e em idade reprodutiva, um macho (≈ 980 g) e uma fêmea em vitelogênese (≈ 240 g) foram capturados no Parque Ecológico Costa, Curitiba (PR). Os dois foram utilizados, após anestesia descrita em III.2.1.1, para obtenção de hepatócitos. Foi utilizado o método padronizado por FILIPAK NETO et al. (2006) para cultivo primário de hepatócitos de traíras. Os animais foram mortos com uma incisão na coluna vertebral, separando a primeira vértebra do crânio, e logo em seguida desinfetados com cloro-hexidina alcoólica a 2%, aplicado com gaze.

As escamas da linha mediano-ventral foram retiradas e o animal levado sob fluxo laminar. Todos os procedimentos seguintes ocorreram com assepsia, sob o fluxo. Após a abertura ventral, o lobo fusiforme direito do fígado foi excisado e perfundido com EDTA a 2 mM em salina tamponada com fosfato (PBS) por 1 h, com fluxo de aproximadamente 4 ml.min^{-1} . O órgão foi cortado e comprimido contra uma tela metálica com poro de ≈ 1 mm, os pedaços foram lavados com meio de cultivo (MC descrito abaixo) e a suspensão de células foi colhida em um recipiente disposto abaixo da tela. As células foram centrifugadas por 1 minuto, em baixa rotação e ressuspensas (lavadas) em novo volume, com MC. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas em MC: RPMI 1640 (pH 7.8),

contendo HEPES (15 mM); NaHCO₃ (6 mM); sulfato de gentamicina (40 mg.l⁻¹); insulina bovina-suína (0,2 U.ml⁻¹); e aprotinina a 2 mg.l⁻¹, como antiproteolítico.

A uma alíquota da suspensão final de células de cada animal foi separada para citometria de fluxo no FACSCalibur, do SCB (UFPR). Após centrifugação as células foram ressuspensas em PBS para contagem no aparelho. A suspensão de “hepatócitos do macho” (doravante denominados apenas de HPs♂) apresentou densidade de 0,6.10⁶ células.ml⁻¹, e a suspensão de “hepatócitos da fêmea” (HPs♀), densidade de 0,7.10⁶ células.ml⁻¹.

As células foram semeadas em microplacas CORNING® de 96 poços (fundo plano, poliestireno, pré-tratamento com carga elétrica para adesão celular). Cada poço recebeu 250 µl da suspensão de HPs♂, ou de HPs♀, com uma quantidade média de $\approx 15.10^4$ células por poço. A adesão ocorreu por 72 horas a 22°C.

III.2.4.2 Indução Experimental da VTG *in vitro*

Após a pré-incubação para adesão (72 horas), dois experimentos foram realizados, um com HPs♂ e outro com HPs♀.

Para HPs♂ houve troca do MC nos tempos 0, 2, 4, 7 e 10 dias, quando o MC foi substituído em todos os poços e preservado para a análise de VTG. Ao término de 10 dias as células (*pool* de 8 poços por tratamento ou grupo) foram desagregadas a temperatura ambiente por 20 minutos, com EDTA a 0,02% e tripsina a 0,05% em PBS, suspensas, centrifugadas e ressuspensas em PBS para contagem por citometria de fluxo. Uma alíquota das amostras serviu para o ensaio de viabilidade com azul de tripano, realizado em câmara citométrica de Neubauer por microscopia de luz visível. A viabilidade média nos tratamentos foi sempre superior a 80%. Para a indução da expressão da VTG por HPs♂ usou-se o 17β-estradiol (E₂) diluído em etanol; e como substância antagonista ao efeito estrogênico, usou-se o citrato de tamoxifeno (TMX: C₂₆H₂₉NO.C₆H₈O₇), também diluído em etanol. Os seguintes tratamentos foram empregados (concentrações de E₂ e TMX segundo SMEETS et al., 1999) a cada 16 poços de microplaca por grupo e em estufa a 22°C:

- a) **CTRL**: grupo controle, sem nenhum tratamento;
- b) **Et-OH**: grupo controle de etanol a 0,15% (v/v) no MC;
- c) **E₂**: grupo induzido com E₂ a 1 μ M;
- d) **TMX**: grupo controle de citotoxicidade ao TMX a 6 μ M;
- e) **E₂+TMX**: grupo controle de ação anti-estrogênica (E₂ a 1 μ M e TMX a 6 μ M).

Para os HPs \varnothing houve a inclusão de soro bovino fetal a 10% (v/v) no MC, este foi trocado nos tempos 0, 2 e 4 dias, quando o MC foi substituído em todos os poços e preservado para a análise de VTG. Ao término de 4 dias as células foram desagregadas como descrito acima, centrifugadas e ressuspensas em PBS para contagem por citometria de fluxo (*pool* de 8 poços por tratamento). Uma alíquota das amostras serviu para o ensaio de viabilidade descrito acima. A viabilidade média nos tratamentos foi sempre superior a 80%. Para a indução da expressão da VTG por HPs \varnothing usou-se o 17 α -etinil-estradiol (EE₂: C₂₀H₂₄O₂) diluído em etanol; e como substância antagonista ao efeito estrogênico, usou-se o citrato de tamoxifeno (TMX), também diluído em etanol. Os seguintes tratamentos foram empregados, a cada 16 poços de microplaca por grupo e em estufa a 22°C:

- a) **CTRL**: grupo controle, sem nenhum tratamento;
- b) **Et-OH**: grupo controle de etanol a 0,15% (v/v) no MC;
- c) **EE₂**: grupo induzido com EE₂ a 9 μ M;
- d) **TMX**: grupo controle de citotoxicidade ao TMX a 9 μ M;
- e) **EE₂+TMX**: grupo controle de ação anti-estrogênica (E₂ e TMX a 9 μ M).

As amostras de MC foram analisadas por *SDS-PAGE* (empilhamento a 5% e separação a 7–9%), segundo LAEMMLI (1970), seguida de coloração com *CBB*, ou sujeitas a imuno-detecção da VTG por WB. Ver apêndice 3.

Algumas das amostras de MC coletadas do experimento com HPs \varnothing tiveram seus teores protéicos concentrados através da precipitação com ácido tricloroacético (TCA) a 8% (m/v) em solução aquosa, na razão de 1:2 (v/v). As proteínas precipitadas em suspensão foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. Esse procedimento permitiu que fossem aplicadas ao gel de eletroforese, quantidades

de proteína relativas a um volume de MC maior (25–125 μ l) do que a capacidade limite (20 μ l) do aparato utilizado.

Também foi testada, para as amostras de MC, uma variante do tampão de desnaturação da amostra (TDA) concentrado 4 \times e sem o β -mercapto-etanol como agente redutor.

A VTG é liberada no sangue pelos hepatócitos *in vivo*, por exocitose. Pressupõe-se portanto sua presença no MC de experimentos *in vitro*. Contudo não foi possível precipitar com TCA nenhuma proteína do MC oriundo do experimento com HPs σ . Também não foi possível a precipitação seletiva da VTG com EDTA e $MgCl_2$ (descrita em III.2.1.2) a partir das amostras de MC de ambos os ensaios *in vitro*.

Devido a esse fato, foram adicionados 20 μ l de TDA 1 \times sobre os HPs σ preservados a $-75^\circ C$, procedimento repetido em 8 poços (*pool*) por tratamento. Cada *pool* foi submetido a $100^\circ C$ por 10 minutos e em seguida “passado” por uma agulha fina (13 \times 3,8) para a quebra de DNA. Vinte microlitros de amostra de cada *pool* foram aplicados por linha de gel de eletroforese, correspondendo aproximadamente à média de células contidas em 1 poço.

A VTG do MC do experimento com HPs σ , após *SDS-PAGE-WB*, foi quantificada por análise de imagem (quantificação relativa) pelo programa de distribuição gratuita, *Image Tool*[®] da UTHSCSA (desenvolvido pela *University of Texas Health Science Center at San Antonio*). A imagem da membrana de nitrocelulose foi digitalizada em alta definição (1200 dpi), convertida para tons de cinza (graduação de 0–256) e o parâmetro aferido pelo *Image Tool*[®] foi a densidade integrada das bandas (intensidade total), que correspondente ao produto da média da intensidade (média de tons de cinza, em cada *pixel* integrante da banda de VTG), pelo número de *pixels* da banda.

Os valores obtidos dessa análise e os dados de citometria de fluxo (contagem de células) serviram à aplicação do Índice Vitelogênico para ensaios *in vitro* de estrogenicidade (I_{VTGh}), com emprego da equação (11). Ver III.1.2.4.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA VTG *IN VIVO*

O hexa-hidrobenzoato de estradiol, administrado por via intraperitoneal (iip) na dose de 20 mg.kg⁻¹, induziu a expressão da VTG em *Hoplias malabaricus*, 15 dias após a iip (dose única), como demonstrado com a VTG plasmática analisada por *SDS-PAGE*, seguida de coloração com *CBB*. Ver figura 6.

O método de isolamento da VTG plasmática através da precipitação com EDTA e MgCl₂ (SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993) eliminou grande parte das proteínas plasmáticas de *Hoplias malabaricus*, quando de uma análise subjetiva e pelo método empregado (*SDS-PAGE-CBB*, fig. 6).

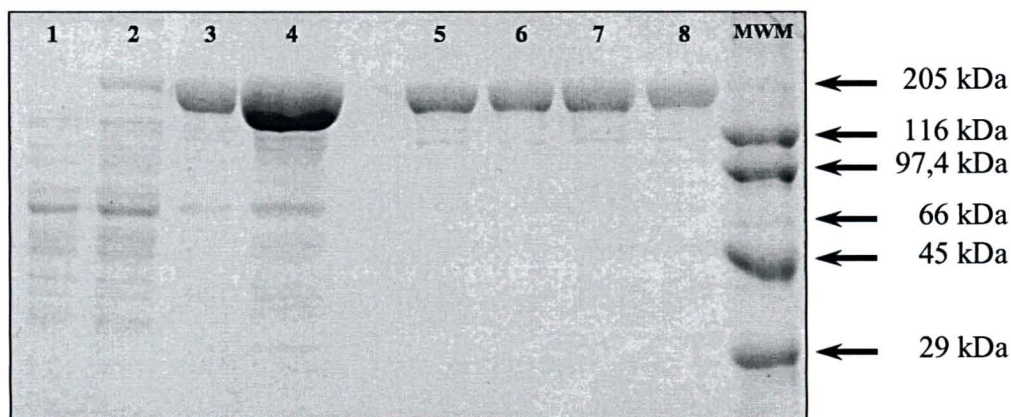
O plasma de macho jovem de *Hoplias malabaricus*, analisado por *SDS-PAGE-CBB*, não apresentou a banda correspondente à VTG (\approx 200 kDa), como ilustrado na figura 6.

O plasma de fêmea jovem de *Hoplias malabaricus*, analisado por *SDS-PAGE-CBB*, apresentou a banda correspondente à VTG, mas com fraca intensidade, indicando que o animal estava em estágios iniciais de vitelogênese, fato confirmado pela análise macroscópica das gônadas. É provável, devido ao tamanho da fêmea (26,1 g) que ela estivesse entrando no seu primeiro período de vitelogênese, no início de sua maturação sexual. Ver figura 6.

III.3.2 EFEITO DO CHUMBO SOBRE A EXPRESSÃO DA VTG *IN VIVO*

O 17 β -estradiol (E₂) administrado por iip na dose de 10 mg.kg⁻¹ induziu a expressão da VTG em *Hoplias malabaricus* (15 dias após dose única), como demonstrado com a VTG plasmática analisada por *SDS-PAGE-CBB* e em comparação ao plasma de um macho jovem não induzido. Ver figura 7a.

FIGURA 6 – ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE *HOPLIAS MALABARICUS*



LEGENDA: Empilhamento com acrilamida a 4% e separação a 9%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Desnaturação em TRIS-HCl a 62,5 mM (pH 6,8), com glicerol a 10% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), β -mercapto-etanol a 5% (v/v), e azul de bromofenol a $\approx 0,001\%$ (m/v); 1 minuto a 100°C.

O plasma do **macho adulto** foi coletado após 15 dias de indução por **20 mg.kg⁻¹** de **hexa-hidrobenzoato de estradiol**, administrado intraperitonealmente e não foi congelado antes da análise aqui ilustrada. A linha 6 ilustra o imunógeno administrado em coelhos para produção do anti-soro homólogo HOPL (policlonais primários para a imuno-detecção).

MWM: marcador de massa molecular

Linha 1: 200 nl de plasma de **macho jovem** (25,8 g);

Linha 2: 200 nl de plasma de **fêmea jovem** (26,1 g);

Linha 3: 50 nl de plasma de **macho adulto** (494,3 g);

Linha 4: repetição com 200 nl de plasma de **macho adulto** (494,3 g);

Linhas 5 a 8: 50 nl de precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após precipitação do plasma de **macho adulto** em solução de Na₂EDTA.2H₂O adicionada de MgCl₂, gerando as seguintes razões molares finais:

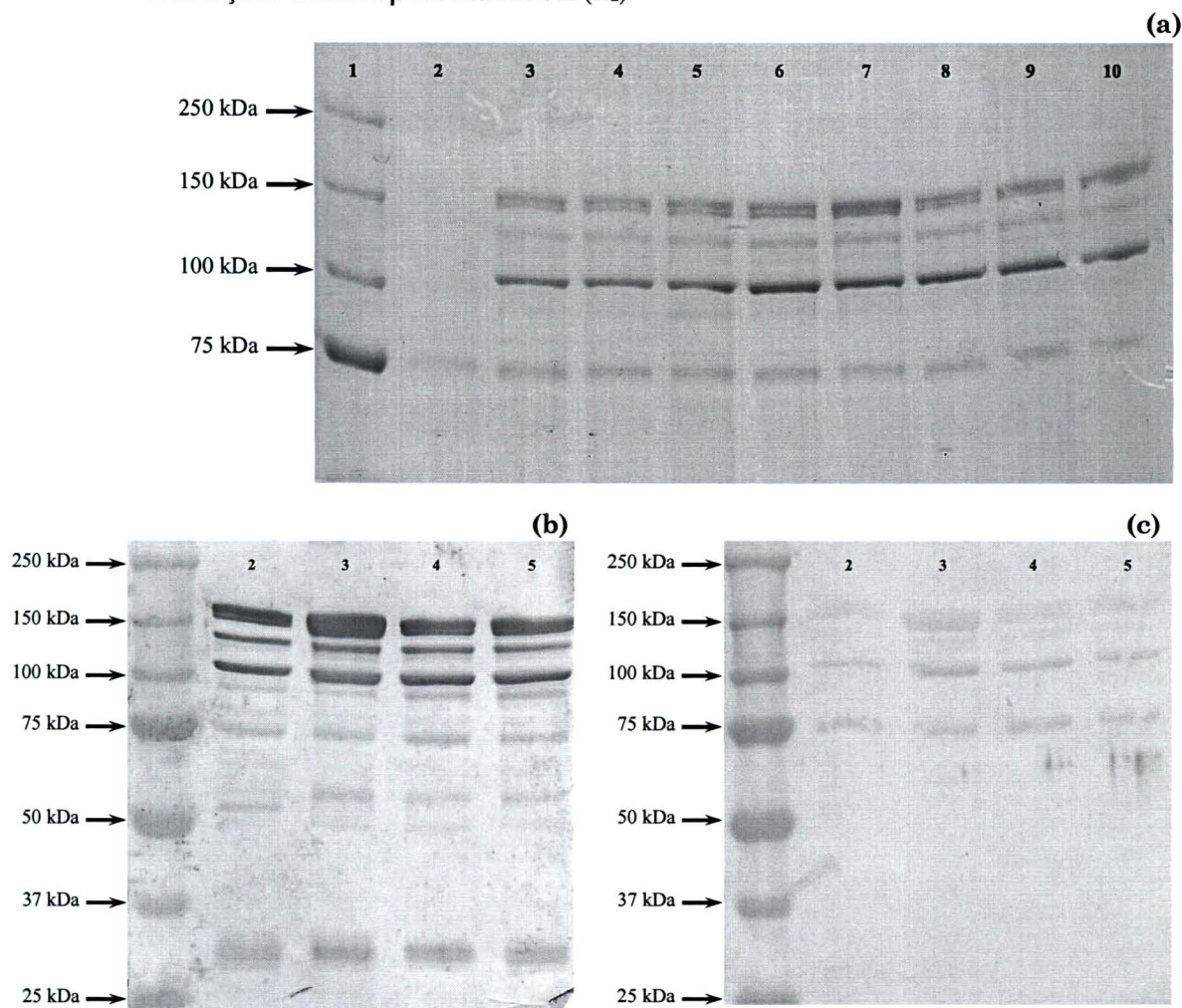
Linha 5: $[\text{EDTA}] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 2,5$

Linha 6: $[\text{EDTA}] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 2,0$

Linha 7: $[\text{EDTA}] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,5$

Linha 8: $[\text{EDTA}] \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,0$

FIGURA 7 – EFEITO AGUDO DO Pb^{++} *IN VIVO* (96 HORAS) SOBRE A PRODUÇÃO DE VITELOGENINA PLASMÁTICA DE *HOPLIAS MALABARICUS*, APÓS 15 DIAS DE INDUÇÃO COM 17β -ESTRADIOL (E_2)



LEGENDA: (a) empilhamento com acrilamida a 5% e separação a 7–9%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Tampão de desnaturação da amostra (TDA) 1×: TRIS-HCl a 62,5 mM (pH 6,8), com glicerol a 10% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), β -mercapto-etanol a 5% (v/v), e azul de bromofenol a $\approx 0,001\%$ (m/v); 2 minutos a 100°C . Volume de plasma aplicado por linha: 100 nl.

Linha 1: marcador de massa molecular recombinante e pré-corado (BioRad®);

Linha 2: pool de plasma dos 3 machos do grupo controle;

Linha 3: pool de plasma dos 3 machos do grupo controle de indução – injeção (ip) única de $10 \text{ mg } E_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (15 dias de indução);

Linhas 4 a 10: todos os animais injetados com $10 \text{ mg } E_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ e após 15 dias de indução, injetados com as seguintes doses de chumbo (96 h de exposição):

Linha 4: pool de plasma dos 3 machos do grupo de $7 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 5: pool de plasma dos 2 machos do grupo de $21 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 6: plasma da fêmea do grupo de $21 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 7: plasma da fêmea do grupo de $63 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 8: pool de plasma dos 2 machos do grupo de $63 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 9: plasma de 1 macho do grupo de $100 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$;

Linha 10: plasma de 1 macho do grupo de $100 \mu\text{g } Pb^{++} \cdot \text{g}^{-1}$.

(b) e (c): Imuno-deteção por *Western Blot*: incubações com policlonal primário realizadas em salina tamponada com Tris, pH 7,5 (TBS) contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 (TTBS) e 5% de leite (m/v), com oscilação orbital, por 2 horas e a temperatura ambiente.

- Linha 1:** marcador de massa molecular recombinante e pré-corado (BioRad®);
Linha 2: plasma de 1 macho do grupo **controle de indução** – injeção (ip) única de **10 mg E₂.kg⁻¹ (15 dias** de indução);
Linha 3: plasma da fêmea do grupo de **21 µg Pb⁺⁺.g⁻¹**;
Linha 4: plasma de 1 macho do grupo de **63 µg Pb⁺⁺.g⁻¹**;
Linha 5: plasma de 1 macho do grupo de **100 µg Pb⁺⁺.g⁻¹**;
(b) anti-soro HOPL (1:3000): 20 segundos de reação da fosfatase alcalina
(c) anti-soro SALA (1:3000): 15 minutos de reação da fosfatase alcalina

Nenhuma das quatro doses de Pb⁺⁺ administradas simultaneamente ao E₂, 15 dias após a indução, produziu efeito anti-estrogênico após 96 horas de exposição via iip. Isso quando da análise subjetiva das amostras de plasma por *SDS-PAGE-CBB* (fig. 7a), ou por *SDS-PAGE-WB*, através da reação imuno-química entre a VTG e os anti-soros HOPL (fig. 7b) e SALA (fig. 7c).

Há um aparente efeito estrogênico causado pelas doses iip de 21 e 63 µg Pb⁺⁺.g⁻¹ (linhas 6 e 7 da fig. 7a, respectivamente, e linha 3 da fig. 7b), contudo isso foi atribuído ao fato dessas amostras de plasma serem de fêmeas. Os 18 animais foram analisados em separado por *SDS-PAGE* (não ilustrado), antes de comporem os *pools* de plasma (mistura de volumes iguais) dos machos da fig. 7a.

O anti-soro HOPL mostrou-se mais imuno-reativo que o SALA, nas mesmas condições de incubação (2 h a temperatura ambiente, com oscilação orbital), pois a reação da fosfatase alcalina para o HOPL produziu um sinal forte em 20 segundos, enquanto que para o SALA, um sinal bem mais fraco em 15 minutos, ambas no escuro.

Em outra condição de incubação (não ilustrado) e em relação à maior intensidade de sinal e especificidade à VTG plasmática de *Hoplias malabaricus*, os 4 anti-soros testados puderam ser classificados, do mais eficiente para o menos, como SALP > SPAU > SALA > HOPL: 16 horas a 4°C com agitação orbital constante. O aumento da “estringência” na imuno-reatividade, com a permanência do leite (do bloqueio), a adição de Tween 20 a 0,1% (v/v), o aumento da temperatura (de 4°C para temperatura ambiente) e a diminuição do tempo de incubação (para 2 h), aumentou a especificidade antígeno-anticorpo por alterações na afinidade química, o que tornou o anti-soro homólogo mais eficiente que os outros três. Nessas condições a imuno-reação cruzada perdeu especificidade e intensidade de sinal.

III.3.3 ESTROGENICIDADE *IN VITRO*

III.3.3.1 Análises das Amostras de Meio de Cultivo

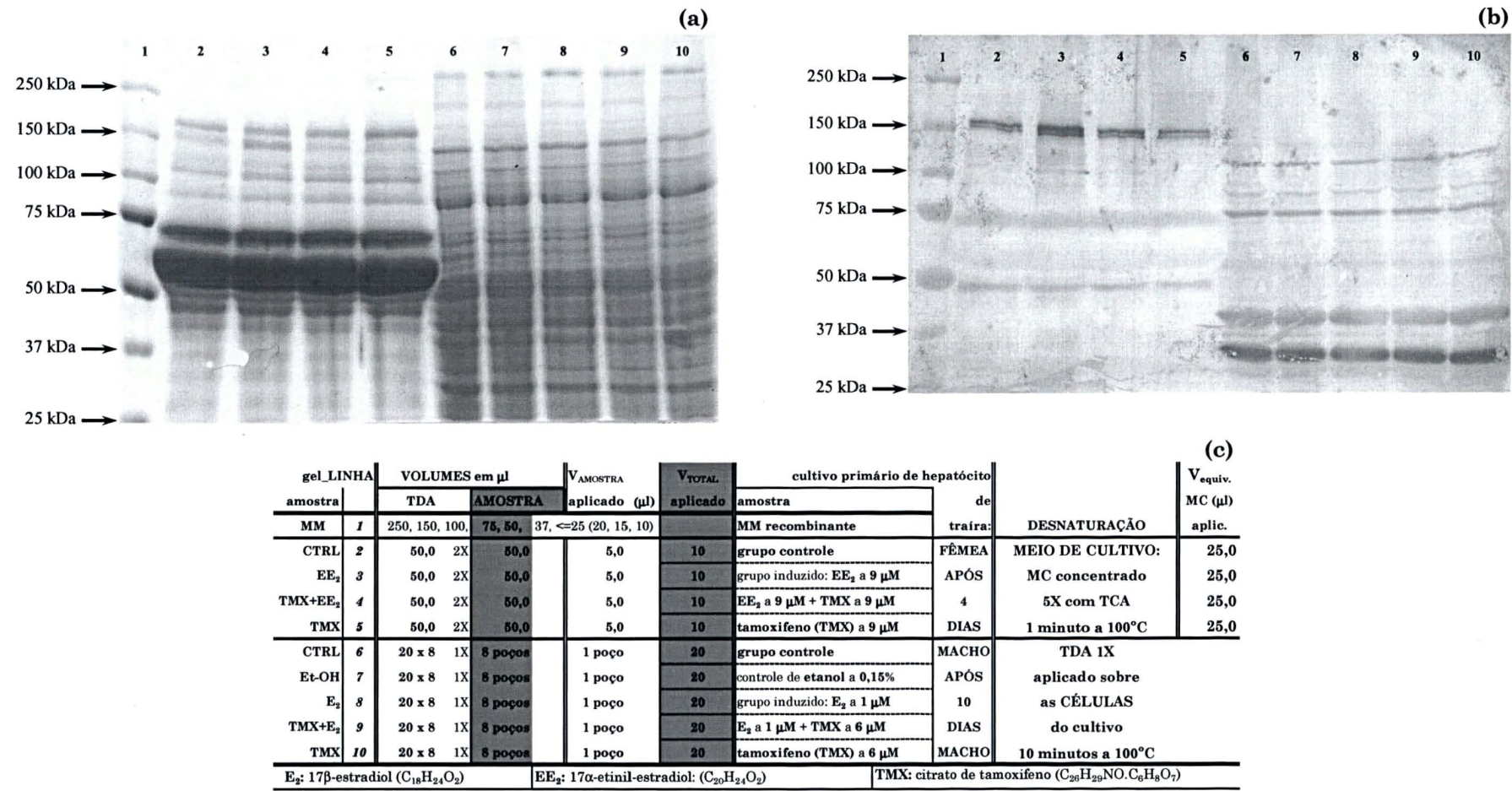
Os HPs \varnothing produziram e liberaram a VTG no MC em todos os tratamentos (CTRL, Et-OH, EE₂, TMX, EE₂+TMX, ver III.2.4.2), já a partir do primeiro dia (T₀) após a adesão das células (72 h). Após 4 dias o EE₂ induziu a expressão da VTG, quando essa foi comparada a do grupo controle no T₀ (não ilustrado) e com a de todos os grupos no T₄ (após 96 horas), como ilustrado na figura 8.

Os HPs \varnothing após 10 dias, não produziram nenhuma VTG detectável no MC, pela imuno-reação cruzada com o anti-soro SALP (linhas 9 e 10 da fig. 9) e o mesmo foi observado com o anti-soro HOPL ou por *SDS-PAGE-CBB* (não ilustrado). Também não foi possível a obtenção de nenhum precipitado protéico com TCA ou EDTA-MgCl₂, das amostras de MC preservadas do experimento com HPs \varnothing .

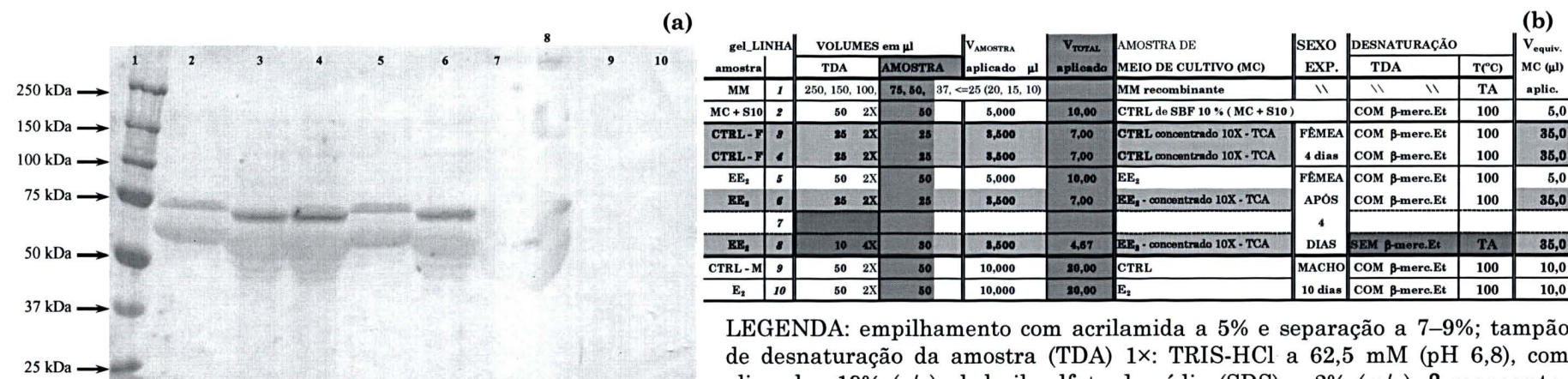
Os anti-soros SALP (fig. 9) e SPAU (fig. 10) mostraram-se pouco imuno-reativos contra a VTG contida no MC (HPs \varnothing). O SPAU produziu um sinal mais forte para a VTG, com menos tempo de reação da fosfatase alcalina (40 segundos), quando comparado ao SALP (15 minutos). Contudo as condições de incubação foram distintas: 16 h a 8–10°C para o SPAU e 2 h a temperatura ambiente para o SALP, ambos com oscilação orbital constante. Nenhum dos dois demonstrou um bom grau de especificidade contra a VTG, já que reagiram com proteínas do soro bovino fetal empregado no experimento com HPs \varnothing . Um controle desse soro a 10% no MC, que não entrou em contato com nenhum hepatócito demonstra esse fato (ver linha 2, fig. 9). A precipitação das amostras de MC com TCA provocou quebra nas proteínas do soro bovino, aumentando sua mobilidade eletroforética (fig. 9).

A variante do tampão de desnaturação da amostra (TDA 4×) sem o agente redutor (β -mercapto-etanol) restringiu a mobilidade eletroforética das proteínas aplicadas ao gel (ver linha 8, fig. 9), produzindo uma corrida excessivamente "arrastada" para essa linha, sem a devida separação das bandas.

FIGURA 8 – IMUNO-DETECÇÃO DA VITELOGENINA PRODUZIDA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS*: (ANTI)ESTROGENICIDADE *IN VITRO*



LEGENDA: (a) empilhamento com acrilamida a 5% e separação a 7–9%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Tampão de desnaturação da amostra (TDA) 1×: TRIS-HCl a 62,5 mM (pH 6,8), com glicerol a 10% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), β-mercpto-etanol a 5% (v/v), e azul de bromofenol a ≈ 0,001% (m/v); (b) imuno-deteção da VTG (≈150 kDa) por *Western Blot* do padrão eletroforético obtido em (a): incubação com policlonal primário (*anti-soro HOPL*) 1:3000 em TTBS, com 5% de leite (m/v), com oscilação orbital, por 2 horas e a temperatura ambiente; 20 segundos de reação da fosfatase alcalina; (c) planilha esquemática utilizada na montagem da eletroforese.

FIGURA 9 – ANÁLISE DO MEIO DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS*

etanol a 5% (exceto linhas 7 e 8), e azul de bromofenol a $\approx 0,001\%$ (m/v); (a) Western Blot do padrão eletroforético obtido com amostras de meio de cultivo (MC): incubação com policlonal primário (**anti-soro SALP**) 1:3000 em TTBS, com 5% de leite (m/v), com oscilação orbital, por 2 horas e a temperatura ambiente (TA); 15 minutos de reação da fosfatase alcalina; (b) planilha esquemática utilizada na montagem da eletroforese, onde:

MM: marcador de massa molecular recombinante e pré-corado;

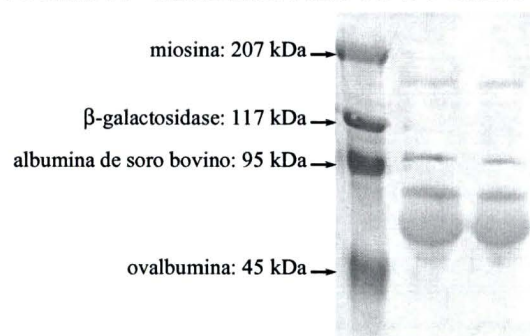
MC + S10: controle de SORO BOVINO FETAL a 10% (v/v) em MC recém preparado;

CTRL-F: MC do grupo controle (sem tratamento) de hepatócitos de FÊMEA no T₄ (4 dias), após adesão das células por 72 horas;

EE₂: MC do grupo induzido (hepatócitos de FÊMEA) com 17 α -etnil-estradiol a 9 μ M, após 4 dias;

CTRL-M: MC do grupo controle (sem tratamento) de hepatócitos de MACHO, após 10 dias;

E₂: MC do grupo induzido (hepatócitos de MACHO) com 17 β -estradiol a 1 μ M, após 10 dias.

FIGURA 10 –ANÁLISE PILOTO DO MEIO DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS* FÊMEA

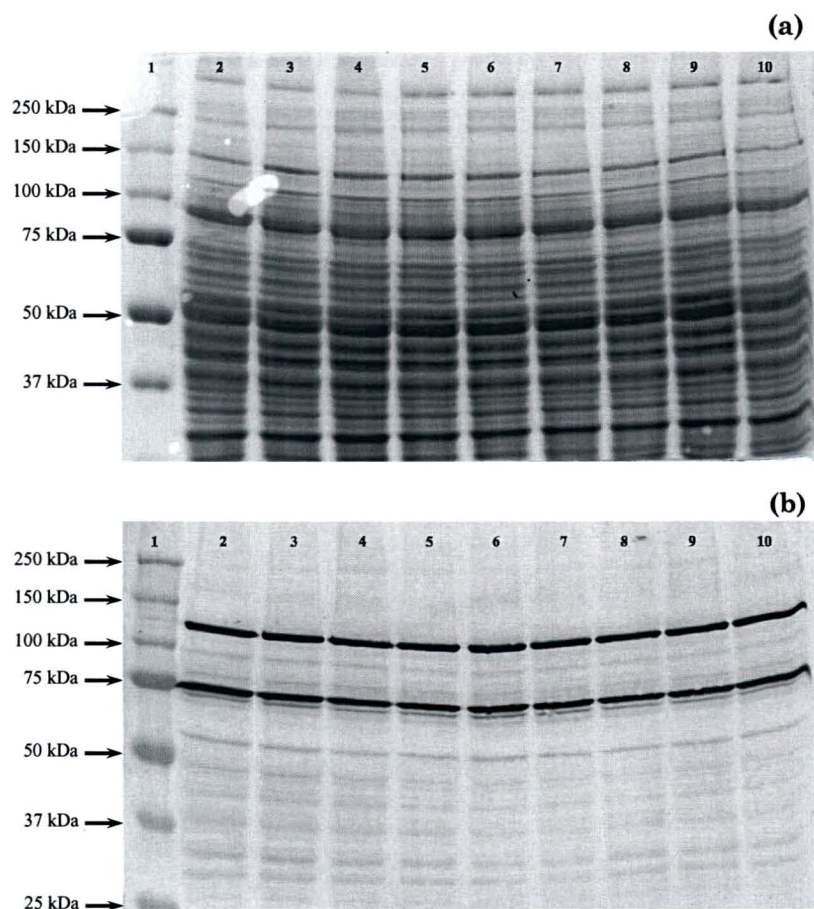
LEGENDA: empilhamento com acrilamida a 5% e separação a 7–9%; tampão de desnaturação da amostra (TDA) 1 \times : TRIS-HCl a 62,5 mM (pH 6,8), com glicerol a 10% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), β-mercpto-etanol a 5%, e azul de bromofenol a $\approx 0,001\%$; Western Blot do padrão eletroforético obtido com amostras de meio de cultivo (MC): incubação com policlonal primário (**anti-soro SPAU**) 1:3000 em TTBS, com 5% de leite (m/v), com oscilação orbital, por 16 horas a 8–10°C; 40 segundos de reação da fosfatase alcalina; As duas linhas são MC de um grupo sem tratamento (ensaio piloto) de hepatócitos de FÊMEA.

III.3.3.2 Análises das Amostras de Hepatócitos do Macho (HPs♂)

A análise das proteínas dos HPs♂ aplicados ao gel, após intensa desnaturação (10 minutos a 100°C com TDA 1×) revelaram duas fortes bandas, detectadas pela reação imuno-química com os anti-soros HOPL (fig. 8) e SALP (fig. 11): uma banda entre 150 e 100 kDa e outra com ≈ 75 kDa. Presume-se que essas duas bandas correspondam à maior parte da VTG intracelular dos hepatócitos. Os dois padrões de mobilidade eletroforética distintos podem ser explicados pela desnaturação, que provavelmente quebrou a VTG em 2 partes de menor massa molecular. Não houve diferença para a intensidade do sinal, obtido nessas 2 bandas, entre os tratamentos do experimento com HPs♂.

A imuno-reação do anti-soro HOPL (fig. 8) detectou também outras duas bandas com forte sinal, e com massa molecular aproximada de 45 e 30 kDa. Essa reação é considerada aqui como não específica para a VTG. Já o SALP não reagiu com tais proteínas celulares (fig. 11). As condições de incubação foram distintas: 16 horas a 8–10°C para o SALP e 2 h a temperatura ambiente para o HOPL, ambos com oscilação orbital constante. O tempo de reação da fosfatase alcalina foi igual para ambos (20 segundos). O SALP produziu um sinal bem mais “limpo” que o HOPL, que gerou bastante coloração de fundo (*background*) e marcação não específica.

FIGURA 11 –ANÁLISE DAS CÉLULAS DO CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS* MACHO, APÓS DEZ DIAS DE CULTIVO



LEGENDA: **(a)** empilhamento com acrilamida a 5% e separação a 7–9%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Tampão de desnaturação da amostra (TDA) 1×: TRIS-HCl a 62,5 mM (pH 6,8), com glicerol a 10% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), β-mercapto-etanol a 5% (v/v), e azul de bromofenol a ≈ 0,001% (m/v); TDA 1× aplicado sobre as células, na microplaca; desnaturação intensa de 10 minutos a 100°C. Volume de amostra aplicado por linha corresponde à quantidade de células de 1 poço de microplaca.

(b) imuno-deteccção da VTG (≈ 75 e 100–150 kDa) por *Western Blot* do padrão eletroforético obtido em (a): incubação com policlonal primário (**anti-soro SALP**) 1:3000 em TTBS, sem o leite do bloqueio, com oscilação orbital por 16 horas a 8–10°C; 20 segundos de reação da fosfatase alcalina. Para (a) e (b):

Linha 1: marcador de massa molecular recombinante e pré-corado (BioRad®);

Linhas 2 e 3: células do **grupo controle** (sem tratamento);

Linha 4: células do grupo **controle de etanol** a 0,15% (v/v);

Linhas 5 e 6: células do grupo induzido com 17β-estradiol (**E₂**) a 1 μM;

Linhas 7 e 8: células do grupo tratado com tamoxifeno (**TMX**) a 6 μM;

Linhas 9 e 10: células do grupo tratado com **E₂** a 1 μM e **TMX** a 6 μM.

III.3.4 APLICAÇÃO DO I_{VTG} PARA ESTROGENICIDADE *IN VITRO*

A análise subjetiva (*SDS-PAGE-WB*) da indução por EE_2 (HPs♀) pôde revelar a expressão diferenciada da VTG, entre os tratamentos (ver III.2.4.2): $TMX < CTRL \approx Et-OH \approx EE_2+TMX < EE_2$ (não ilustrado). Contudo o método de imuno-deteção com o anti-soro HOPL não se mostrou sensível o suficiente para uma quantificação acurada e precisa dos teores de VTG no MC. Isso ocorreu por dois motivos:

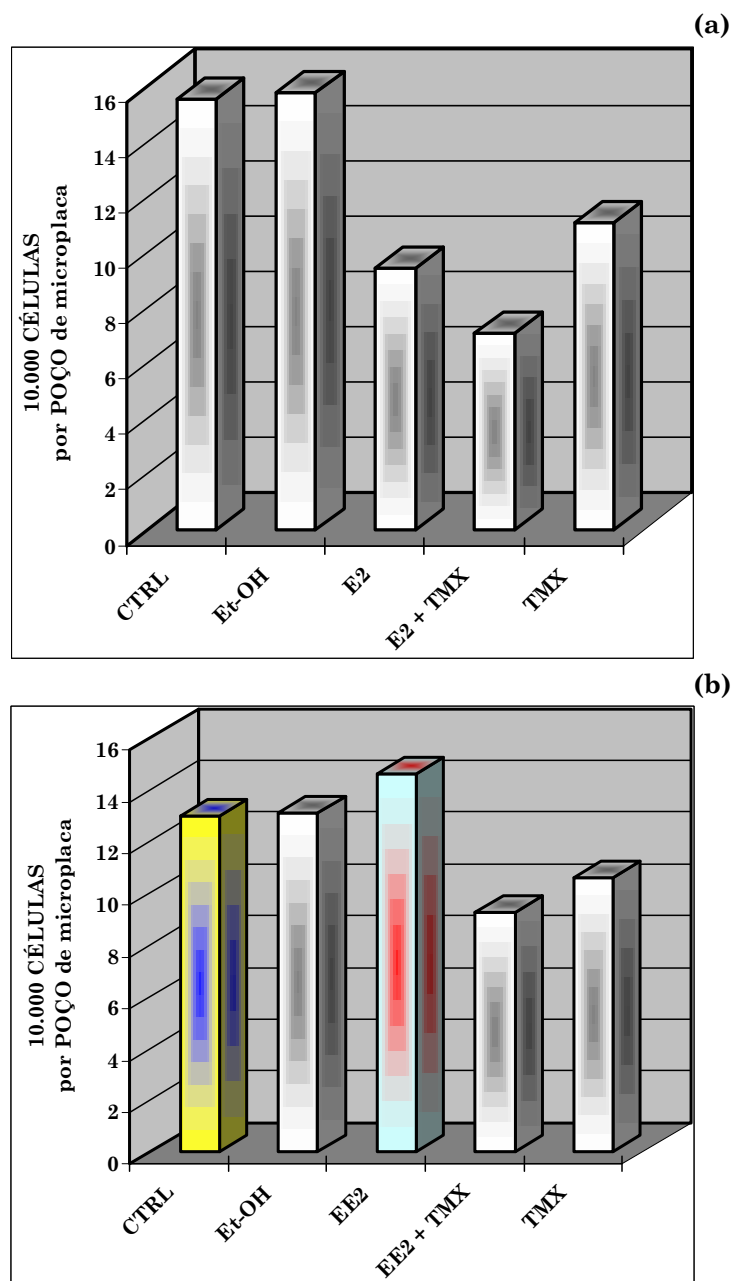
- a) o emprego do anti-soro HOPL invariavelmente produziu uma coloração de fundo ou *background* excessivo (a melhor condição está ilustrada na figura 8b);
- b) as proteínas do soro bovino fetal empregado no MC (HPs♀) restringiram a análise de volumes satisfatórios de MC (com maiores quantidades de VTG), por limitações impostas pela técnica; quantidades de proteínas obtidas com TCA e correspondentes a volumes maiores que 35 μ l produziram “corridas arrastadas” como padrões de eletroforese.

Por outro lado na equação (11), do Índice Vitelogênico para ensaios *in vitro* de estrogénicidade (I_{VTGh}), os valores para quantidades de VTG sofrem uma correção que permite que até métodos pouco acurados sejam empregados na comparação entre grupos, eliminando o carácter subjetivo da análise.

Com a banda correspondente à VTG das linhas 2, 3, 4 e 5 da figura 8b (respectivamente os tratamentos CTRL, EE_2 , EE_2+TMX e TMX) foi realizada por análise de imagem (densidade integrada descrita em III.2.4.2) uma quantificação relativa da intensidade das bandas de VTG.

Como o número de células ao final do experimento foi sempre menor que a densidade da suspensão semeada nas placas, pôde-se observar diferentes padrões de citotoxicidade, entre os dois experimentos e entre os tratamentos. O gráfico 8 demonstra os resultados da citometria de fluxo (contagem das células desagregadas com EDTA / Tripsina) ao final dos experimentos com HPs♂ (10 dias, gráf. 8a) e com HPs♀ (4 dias, gráf. 8b).

Foi então aplicado o I_{VTGh} (figura 12), como concebido pela equação (11) em III.1.2.4, com os dados da intensidade das bandas de VTG e do gráfico 8b.

GRÁFICO 8 – CITOMETRIA DE FLUXO APÓS EXPERIMENTOS *IN VITRO*

FONTE: O autor

NOTAS: Células do fígado de *Hoplias malabaricus* cultivadas a partir do animal **macho (a)**, após 3 dias para adesão, seguidos de 10 dias de exposição; ou **fêmea (b)**, após 3 dias para adesão e 4 dias de exposição. Células desagregadas na microplaca com EDTA e tripsina, compondo grupos (*pools*) de 8 poços (com o fundo totalmente coberto de células) para cada tratamento. O resultado final expresso é a média (realizada com a pipeta) do número de células em 1 poço, por tratamento:

CTRL: células do **grupo controle** (sem tratamento);

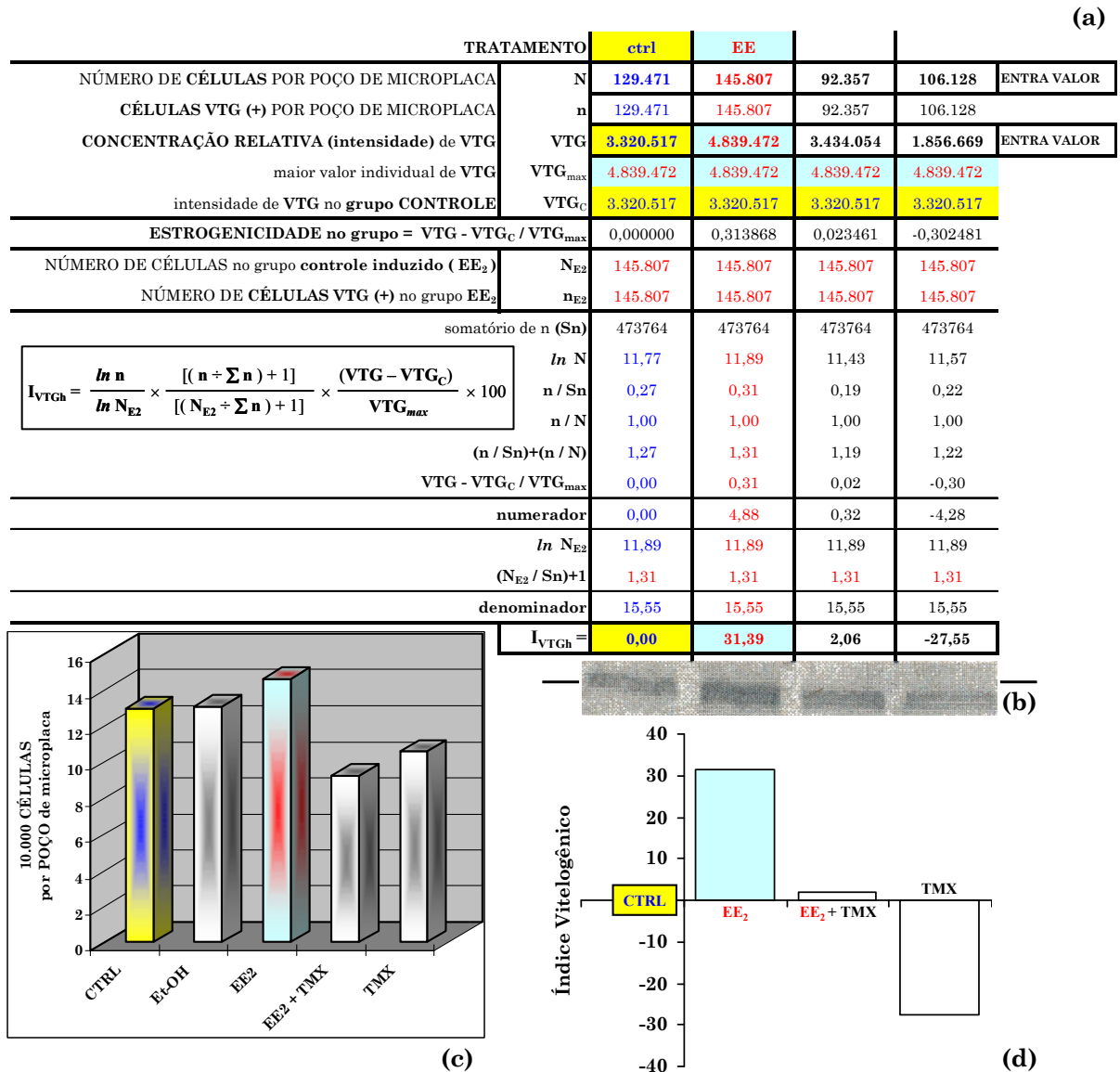
Et-OH: células do grupo **controle de etanol** a 0,15% (v/v);

E₂: células do grupo induzido com 17β-estradiol a 1 μM;

TMX: células do grupo tratado com tamoxifeno a 6 μM em (a) e a 9 μM em (b);

EE₂: células do grupo tratado com 17α-etinil-estradiol a 9 μM.

FIGURA 12 – ÍNDICE VITELOGÊNICO PARA ENSAIOS *IN VITRO* DE ESTROGENICIDADE (I_{VTGh}): APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO (11)



LEGENDA:

- (a) decomposição da equação (11), descrita em III.1.2.4 e que figura inserida na planilha; a **figura 8b** e o **gráfico 8b** provêm os valores de entrada na planilha;
- (b) área da **figura 8b** utilizada na análise de imagem para determinação da intensidade da banda correspondente a VTG (≈ 150 kDa: barras horizontais cingindo a figura) de hepatócitos de traíra fêmea cultivados por 4 dias.
- (c) **gráfico 8b** descrito na página anterior;
- (d) **Índice Vitelogenico** para ensaios *in vitro* de estrogenicidade (I_{VTGh}) aplicado ao cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*.

III.4 DISCUSSÃO

Como esperado, tanto o 17β -estradiol (E_2), quanto o hexa-hidrobenzoato de estradiol (6HB- E_2) induziram a síntese da VTG de *Hoplias malabaricus in vivo*, nas respectivas doses de 10 e 20 mg.kg⁻¹ (iip), inclusive em animais machos (1 adulto e 3 jovens).

WERNER et al. (2003) revisam que estações de tratamento de esgoto já foram relatadas contendo em seus efluentes concentrações de até 0,021 mg.l⁻¹ de E_2 (Brasil); 7 ng.l⁻¹ de 17α -etinil-estradiol (EE_2 , Reino Unido); 17 ng.l⁻¹ de EE_2 (Alemanha); 8 ng.l⁻¹ de E_2 e 9 ng.l⁻¹ de 17α -estradiol (Canadá). No caso particular brasileiro, onde muito do esgoto doméstico ainda vai para corpos de água e sistemas de drenagem de bacias, populações naturais de peixes podem estar sujeitas a concentrações muito superiores às supracitadas, de compostos que desregulam o sistema neuro-endócrino-reprodutor de peixes, este facilmente susceptível a variáveis abióticas como intervenientes físico-químicos (KIME, 1999).

O fato de os exemplares de *Hoplias malabaricus* aqui analisados, da exposição intraperitoneal ao Pb^{++} , não apresentarem efeito estrogênico, identifica esses animais como resistentes a condições adversas, no que diz respeito a viabilidade populacional dependente desse fator (produção de vitelo). Contudo estudos mais completos do efeito do chumbo em *Hoplias malabaricus* devem ainda ser conduzidos para tal afirmação.

A ação estrogênica aqui observada no plasma de fêmeas expostas ao chumbo, e comparadas aos machos, é um resultado contraditório pois os machos não podem incorporar a VTG em suas gônadas. Esperava-se que os machos apresentassem menores teores de VTG plasmática que as fêmeas. Contudo alterações causadas pelo Pb^{++} na regulação fisiológica determinada pelo “eixo” cérebro-hipotálamo-hipófise-gônada podem ter produzido tal efeito diferencial. Outrossim, a demonstração de que essa incongruência não é relativa a fatores aleatórios (erro amostral) deve ser suportada com grupos de tamanho satisfatório e métodos acurados de quantificação da VTG.

A traíra não apresenta dimorfismo sexual e portanto grandes grupos devem compor bioensaios, para que variações significativas nas quantidades de VTG possam demonstrar a “situação” reprodutiva de ambos os sexos, frente a contaminantes. Embora traíras grandes (> 1 kg), em estágio avançado de vitelogênese possam ser determinadas como fêmeas, da intervenção com otoscópio e visualização do ovário, apenas este grupo não representa a população total em condições naturais e a técnica pode ainda gerar lesões e causa estresse, não recomendados em bioensaios. Fatos como esses conduziram o Laboratório de Toxicologia Celular à implementação de testes que empregam o cultivo primário de hepatócitos.

Em adição estudos *in vitro* com hepatócitos de truta revelam ação anti-estrogênica (supressão da síntese de VTG) causada pelo cádmio e pelo alumínio, como descrito por MUGIYA e TANAHASHI (1998) e HWANG, NAGAWA e MUGIYA (2000).

O 17 α -etinil-estradiol (EE₂) induziu a síntese e a liberação da VTG por hepatócitos de fêmeas de *Hoplias malabaricus*, no meio de cultivo primário (MC). O EE₂ é um estrógeno sintético que está entre os mais potentes xenoestrógenos encontrados em esgotos tratados (LABADIE e BUDZINSKI, 2006).

O relato da indução da expressão de VTG por xenoestrógenos em peixes, ou células de peixes, é amplo: SMEETS et al. (1999); LANTONNELLE et al. (2002); KORDES, RIEBER e GUTZEIT (2002); WERNER et al. (2003); RADICE et al. (2004); BERG, WESTERLUND e OLSSON (2004); ZHONG et al. (2005); GORDON et al. (2006).

Em biomonitoramentos recentes, concentrações de VTG plasmática em peixes machos têm sido utilizadas como resposta indicadora de efeitos estrogênicos em áreas impactadas, como por HINCK et al. (2006) e REMPEL et al. (2006).

Frente ao volume da pesquisa internacional dirigida a esse objeto de estudo, torna-se urgente o desenvolvimento de métodos de monitoramento da (anti)estrogenicidade de substâncias, para as espécies de peixes que ocorram em território nacional. Condições físico-químicas de ambientes aquáticos distintos

influenciam diferencialmente a reprodução em peixes (KIME, 1999). Populações alopátricas de uma mesma espécie de peixe respondem e se adaptam fisiologicamente de forma distinta a contaminantes. O uso de sistemas biológicos que sejam comuns a tais organismos de ambientes distintos é pretendido para se poder comparar, prever e sanear. Assim o operar da célula eucariótica é foco principal de estudos atuais com biomarcadores, a despeito dos já observados polimorfismos moleculares (estruturais) que intervêm numa resposta fisiológica (diferenças de padrões de organização sistêmica).

MIKAWA et al. (2006) clonaram o DNAc da VTG de uma espécie de enguia japonesa (*Conger myriaster*) e encontraram 45–55%, 32–34% e 27–29% de similaridade entre a seqüência de aminoácidos da enguia, deduzida a partir do seqüenciamento do DNA, com a seqüência da VTG de outros peixes, anfíbios e aves, respectivamente.

O método de SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) de purificação parcial da VTG, aqui utilizado para obtenção do imunógeno inoculado nos coelhos, mostrou-se simples e eficaz. Tal método consiste da precipitação da proteína *on bath*, dispensando procedimentos cromatográficos e tem como princípio algumas propriedades moleculares da VTG, determinadas pelo ortofosfato em interações eletrofílicas com o magnésio adicionado, permitindo assim o isolamento por centrifugação. Os autores utilizaram o método com êxito para o isolamento da VTG de 4 espécies de teleósteos, variando a razão molar final entre EDTA^- e Mg^{++} na precipitação. Foram realizados estudos cromatográficos e detecção imuno-química, indicando que é possível precipitar seletivamente a VTG de peixes com tal método, obtendo altos graus de pureza. Por outro lado os autores citam trabalhos em que, com outras espécies de peixes, não foi possível a precipitação da VTG.

A variação supracitada para a razão molar final foi aqui repetida e produziu o mesmo resultado para a VTG induzida *in vivo* (hexa-hidrobenzoato de estradiol: 6HB-E₂) em todas as razões finais analisadas por *SDS-PAGE*. (ver figura 6). PETERS et al. (2001) também conseguiram o isolamento da VTG de enguias através do método descrito acima.

Para a traíra aqui induzida com 6HB-E₂, foi possível a precipitação acidental da VTG apenas com adição de água de torneira sobre um volume remanescente de plasma, nos microtubos usados. O mesmo ocorreu para outras traíras induzidas com E₂, e de localidade diferente daquela exposta ao 6HB-E₂. Contudo o mesmo padrão de massa molecular das proteínas do plasma não foi obtido, contendo o novo padrão, outras proteínas de menor massa molecular, identificadas eletroforeticamente após a precipitação com Mg⁺⁺. Essas proteínas não foram inoculadas nos coelhos para a produção do anti-soro homólogo e podem constituir parte das proteínas do envelope vitelínico, segundo SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993), induzidas pelo E₂. Contudo outras proteínas, também de menor massa molecular que a VTG, foram identificadas com o anti-soro homólogo por imuno-deteção (*Western Blot*). A degradação da VTG em condições redutoras de desnaturação pode ter gerado tal detecção, bem como a marcação não específica resultante de epitopos polissacarídicos da VTG (glicoproteína). A VTG de *Hoplias malabaricus* demonstrou a instabilidade estrutural reportada por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) com estudos cromatográficos, sendo susceptível a degradação por sua alta massa molecular. O padrão eletroforético da figura 6 não pôde ser repetido e atribui-se a isso o congelamento do plasma que, mesmo sendo realizado só uma vez, degradou a VTG.

Teores distintos de fosforilação determinam se a VTG pode ou não ser precipitada pelo método de SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993). Polimorfismos moleculares determinados por distintos teores de serina, treonina e tirosina da VTG devem ser considerados, pois estes são os aminoácidos passíveis de sofrerem a adição pós-transcricional de fosfato inorgânico. A VTG de tilápia (*Oreochromis* sp) tem 13,26% de serina na sua composição total (195 kDa), muitas delas em repetições seqüenciais de mais de três aminoácidos, podendo chegar até vinte (NCBI, 2006). Essa região de seqüências repetidas foi visualizada pelo programa BioEdit v.5.0.9 (HALL, 2001) e uma suposta “quebra” no local foi admitida, gerando dois fragmentos polipeptídicos com \approx 75 e 120 kDa.

Duas proteínas com esses valores de massa aproximados foram identificadas por imuno-deteção da VTG de *Hoplias malabaricus* com o anti-soro

homólogo produzido, a partir do perfil eletroforético das proteínas dos hepatócitos do macho. Contudo nenhuma VTG pôde ser detectada no meio de cultivo usado com os hepatócitos do macho adulto, sugerindo que quando a espécie atinge a maturidade sexual, alguns processos celulares podem ser diferenciados entre machos e fêmeas. Embora se tenha utilizado dois agentes indutores diferentes para a estrogenicidade, nos dois experimentos *in vitro* (macho e fêmea), a condição controle no tempo zero (72 horas após adesão) sugere que traíras macho, quando atingem a maturidade sexual, tenham o transporte subcelular de moléculas ou a exocitose, interrompidos em algum momento da seqüência: retículo endoplasmático rugoso >> Golgi CIS >> Golgi TRANS >> vesícula secretora.

A VTG detectada nas células do macho é aqui caracterizada como resultado de uma produção basal (ou transcrição constitutiva), que durante o ensaio não integrava nenhum dos dois processos conhecidos de secreção celular: exocitose constitutiva ou mediada por sinal químico. Por outro lado, no experimento *in vitro* com células do macho não foi utilizado soro bovino fetal no meio de cultivo e uma decorrente deficiência de zinco ou de fatores de crescimento celular pode ter interrompido a seqüência de eventos supracitada. O constatação da produção *in vivo* de VTG plasmática em machos de *Hoplias malabaricus* suporta o fato de que uma possível carência de elementos moleculares não pôde ser controlada *in vitro* causando a interrupção da secreção de VTG pelas células. Sugere-se o uso soro obtido em peixes para futuros estudos *in vitro*.

O zinco é requerido como cofator essencial na produção de VTG e de outras proteínas, pois mantém a estabilidade dos polirribossomos e de outros componentes envolvidos com mecanismos de síntese protéica. Ao final da vitelogênese o zinco é mobilizado a partir de proteínas de alta massa molecular para as metalotioneína (MTs) de hepatócitos. Durante a vitelogênese os teores hepáticos de MTs declinam, possibilitando a transferência de zinco para componentes essenciais à síntese de VTG. A relação entre a indução da síntese de VTG por EE₂ (via hídrica) e a expressão de MTs foi estudada por WERNER et al. (2003), que demonstraram (para ambos os sexos de *Salvelinus namaycush*) um

decréscimo em teores hepáticos de MTs, mas também a indução sua expressão nos rins. THOMPSON et al. (2003) reportam que a própria VTG é responsável pelo transporte de zinco no plasma. O zinco também é essencial na maturação dos oócitos (KIME, 1999) estando envolvido com a produção de hormônios sexuais esteróides nas gônadas.

O índice vitelogenico para ensaios *in vitro* de indução experimental da VTG (I_{VTGh}) relacionou a resposta biológica obtida por cultivo celular primário de hepatócitos (produção de VTG) com o tamanho da amostra experimental (número médio de células, por poço de microplaca), e com a estrogenicidade estabelecida como padrão, induzida no grupo de referência por EE_2 , essa estrogenicidade também relativa ao “tamanho” do grupo de referência.

A citotoxicidade diferencial entre as células do macho e da fêmea, frente aos tratamentos e aos tempos de manutenção, foi determinada pela contagem de células no final dos ensaios. O grupo controle das células da fêmea (após 7 dias) demonstrou maior citotoxicidade quando comparado ao grupo controle das células do macho (após 13 dias). Para um mesmo sexo não houve diferença entre os controles e o controle de etanol. O tamoxifeno ou sua mistura com o agente indutor (E_2 ou EE_2) produziram um efeito equivalente entre as células do machos e da fêmea. Já o E_2 foi bem mais citotóxico para as células do macho que o EE_2 para as da fêmea, e esse por sua vez, menos citotóxico que a condição controle, sugerindo um efeito de “proteção” para os hepatócitos de fêmeas, caso inverso ao obtido com a exposição hepatócitos do macho ao E_2 .

A principal vantagem do emprego do I_{VTGh} concebido pela equação (11), que visa complementar os parâmetros clássicos de farmacocinética, está no fato de que substâncias que têm efeito citotóxico associado ao efeito anti-estrogênico, este podendo inclusive ser indiretamente decorrente daquele, podem produzir resultados falso-positivos ou subestimados, já que uma fração do decréscimo em quantidade de VTG produzida pode ser devida a um menor número de células expressando a proteína. O I_{VTGh} corrige em parte a fonte de tal erro experimental, por considerar o número de células na análise. Assim mesmo substâncias que promovam uma baixa viabilidade em cultivos podem ser testadas.

Outra vantagem é que substâncias (ou misturas) com efeito estrogênico produzem valores de I_{VTGh} positivos, e aquelas com efeito anti-estrogênico, valores negativos, o que torna fácil a comparação de grupos experimentais. O soro bovino fetal contém moléculas esteróides com possível ação estrogênica, mas a equação do I_{VTGh} suprime a produção do grupo controle da análise, apresentando o valor nulo para qualquer produção de VTG das células controle, e permitindo assim que se use o soro como fonte de componentes moleculares essenciais à célula.

Embora o emprego dos outros índices vitelogênicos aqui propostos não tenha sido demonstrado, considera-se importante o estabelecimento de metodologias que visem avaliar e quantificar a (anti)estrogenicidade *in vivo* e a reprodução viável de populações de peixes, pois estes são eficientes biomarcadores de toxicidade ambiental. Assim estudos que envolvam a reprodução de indivíduos, associada com emprego de modelos ecológicos, podem revelar condições importantes de ambientes impactados, bem como elevar uma resposta biológica individual para um *status* determinante da viabilidade de populações naturais. Outrossim, estudos *in vivo* permitem a abordagem de vários efeitos biológicos associados, decorrentes de uma única causa (xenobiótico), o que leva a asserções mais realísticas do comprometimento fisiológico de uma espécie em risco. Somado a isso tem-se que em ambientes impactados geralmente se encontra mais de uma substância tóxica. Nesse âmbito os estudos *in vitro* são essenciais para se entender os mecanismos moleculares de toxicidade envolvidos com a resposta *in vivo*.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A possibilidade do emprego de condições físico-químicas de ambientes tropicais, da exposição via alimento por longos períodos (subcrônica) e da busca de respostas biológicas subletais, detectáveis e consistentes, caracterizam a espécie *Hoplias malabaricus* como um excelente modelo experimental *in vivo*, na padronização de metodologias para o estabelecimento de biomarcadores de efeito ou de exposição.
- ✓ A determinação da atividade da δ -ALAd acompanhada do monitoramento de parâmetros hematológicos são métodos eficientes para o uso de respostas biológicas individuais (fisiológicas) como biomarcadores de contaminação de peixes *in vivo*.
- ✓ O método aqui empregado para a determinação de alterações nos teores teciduais de metalotioneína, induzidas experimentalmente *in vivo*, não pôde ser efetivado para o emprego dessa resposta como biomarcadora. Sugere-se a utilização de métodos mais acurados, com a quantificação direta (absoluta) da metalotioneína.
- ✓ A produção de vitelogenina plasmática pelo fígado *in vivo* (expressão em hepatócitos) pôde ser induzida experimentalmente com substâncias estrogênicas (via intraperitoneal) em *Hoplias malabaricus* de ambos os sexos em idade reprodutiva, ou em indivíduos sexualmente imaturos.
- ✓ O anti-soro homólogo produzido em coelhos contra a vitelogenina de *Hoplias malabaricus* mostrou-se eficiente para a imuno-deteção.
- ✓ Os anti-soros heterólogos obtidos comercialmente demonstraram diferentes graus de especificidade e de intensidade de sinal (fosfatase alcalina) relacionados com diferentes condições de “estringência” da reação imuno-química cruzada com a vitelogenina de *Hoplias malabaricus*.
- ✓ O chumbo inorgânico divalente não produziu nenhum efeito anti-estrogênico detectável pelo método empregado (imuno-deteção), após bioensaio (administração via intraperitoneal).

- ✓ O emprego de um modelo matemático da ecologia, aplicável em nível populacional e associado com respostas biológicas individuais frente a condições adversas é possível *a priori* dispondo-se do Índice Vitelogênico. Este é considerado como um biomarcador para substâncias que comprometem a reprodução de espécies de peixes, apresentando efeitos (anti)estrogênicos mensurados pela produção de vitelogenina *in vivo*. Contudo a demonstração empírica se faz necessária para o uso do índice.
- ✓ Os ensaios *in vitro* com cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* revelaram aspectos importantes dos mecanismos moleculares de citotoxicidade, obtidos com a exposição das células a substâncias com reconhecida ação (anti)estrogênica.
- ✓ O aplicação do Índice Vitelogênico para Ensaio *in vitro* de Estrogenicidade (I_{VTGh}) permitiu padronizar a comparação de grupos controlados em condições laboratoriais (tratamentos *in vitro*). Isso porque o I_{VTGh} representa a produção molecular de vitelogenina em cada tratamento *in vitro*, onde a resposta é a ação (anti)estrogênica e está relacionada com a quantidade de células que expressam a proteína em cada unidade de cultivo e com a magnitude amostral dos grupos analisados (tratamentos) e de referência (controle induzido com substância de reconhecida ação estrogênica).

LEGENDA: as interações referidas dizem respeito à possibilidade de uma resposta obtida intervir em outra, duas a duas e para um mesmo sistema biológico considerado, a saber, célula, tecido, órgão ou organismo, sem considerar a ascendência de organização sistêmica, ou seja, o que afeta uma célula pode, direta ou indiretamente afetar o organismo e vice-versa. **(1)** interação possível ou observada; **(0)** ausência de interação ou a resposta comparada com ela mesma (em verde). As interações marcadas em vermelho foram constatadas empiricamente ou inferidas pela investigação científica realizada pelo **Laboratório de Toxicologia Celular SCB, UFPR**. As outras foram constatadas por outros grupos de pesquisa com biomarcadores, ou inferidas e deduzidas do contexto teórico pertinente, determinado por publicações científicas nessa área de estudo. O dados do quadro 1 estão sujeitos a modificações, principalmente no que diz respeito a mudança da condição (0) para (1).

δ-ALAd: alterações na atividade da **δ-aminolevulinato desidratase**;

[HEME]: alterações nos teores celulares de grupamentos **HEME**;

préc-HEME: acúmulo **de precursores do grupo HEME**, na célula ou tecidos;

HEMO-prots: alterações estruturais de componentes protéicos que têm o **HEME** integrante: hemoproteínas como **hemoglobina, citocromos e catalases**;

HmtpErtp: alterações na taxa de renovação do estoque de eritrócitos (**eritropoiese**) e do sangue (**hematopoiese**);

(anti)OXI: alterações no **balanço REDOX** de células de órgãos ou tecidos-alvo como sangue, brânquias, fígado e rim;

pró-OXI: “quebra” de macromoléculas (p.ex.: DNA ou citoesqueleto) como efeito da **ação oxidante de espécies reativas de oxigênio**;

MTs: alterações de teores teciduais de **metalotioneínas**;

Zn: alterações na estocagem, distribuição e disponibilização de **zinco em processos celulares**;

ZnP: alterações sistêmicas no **transporte de zinco** por componentes do plasma sanguíneo;

BioT-I (p450): biotransformação de fase I em hepatócitos, com ação do **complexo citocromo oxidase P450** e **monoxigenases** associadas, com utilização de O₂ como substrato;

BioT-II: biotransformação de fase II em hepatócitos, com uso da **glutathione reduzida (GSH)** como substrato;

NeuEndRep: alterações no operar do sistema integrado **neuro-endócrino-reprodutor** (eixo cérebro-hipotálamo-hipófise-gônada);

ESxH: alterações na produção, metabolismo e excreção de **hormônios sexuais esteróides**;

(anti)ESTRG: ação **estrogênica** ou **anti-estrogênica** em tecidos-alvo que respondem a estrógenos;

VTG: ação **(anti)estrogênica** determinada pela quantificação da **expressão de vitelogenina** no hepatócito ou sua produção *in vivo* ou *in vitro*;

VTGinput: incorporação da vitelogenina no oócito, diferenciação do gameta e maturação sexual: **vitelogênese**;

AdHoc: influência de **condições físico-químicas** do meio externo (**fatores abióticos**), como temperatura, dureza da água e fotoperíodo; não inclui a biodisponibilidade e a exposição de xenobiótico(s) considerado(s) como causa da resposta biológica monitorada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, S., SARKAR, B. CHATTERJEE, A. MAHAPATRA, C. T. AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost; *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotox. Environ. Saf.**, 58, 220-226. 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; SUZUKI, H. I.; SAMPAIO, A. A.; BORGES, J. D. R. **Índice de atividade reprodutiva: uma proposta para avaliação da atividade reprodutiva em peixes.** In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, 9., 1991. Resumos. Maringá : UEM. p.53. 1991.
- AISEMBERG, J. et al. Comparative study on two freshwater invertebrates for monitoring environmental lead exposure. **Toxicology**, 210, 45–53. 2005.
- AFFONSO, E. G., POLEZ, V. L. P., CORRÊA, C. F., MAZON, A. F.; ARAUJO, M. R. R., MORAES, G., RATIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleosts fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, C 133, 375-382. 2002.
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 37-48. 2000.
- AKERBOOM, T. P. M.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**. v.77, p.373-382. 1991.
- ALLIN, C.J., WILSON, R. W. Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. **Aquat. Toxicol.**, 51, 213-224. 2000.
- ALVES COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*.** Curitiba : [s.n.], 2001. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ALVES COSTA, J. R. M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological aspects of dietary lead (II) and methylmercury exposure in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** (no prelo). 2006.
- ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 95–104. 2000.
- BAINY, A. C. D. **Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae) e seus efeitos sobre a δ -aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) eritrocitária.** Porto Alegre : [s.n.], 1990. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BERG, A. H.; WESTERLUND, L.; OLSSON, P. E. Regulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17 β -estradiol and cortisol. **General and Comparative Endocrinology**, 135, 276–285. 2004.
- BERGDAHL, I. A.; SHEVELEVA, M.; SCHÜTZ, A.; ARTAMONOVA, V. G.; SKERFVING, S. Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. **Toxicological Sciences**, v. 46, p. 247–253. 1998.

- BEUTLER, E.; LIECHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S., KIPPS, T. J. Measurement of hemoglobin. In: BEUTLER, E., LIECHTMAN, M. A., COLLIER, B. S., KIPPS, T. J. (Ed.). **Willians Hematology**. 5. ed. New York: McGrawHill, 1995. p. 9-10.
- BOLS, N. C., BRUBACHER, J. L., GANASSIN, R. C., LEE, L. E. J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Develop. Comp. Immunol.**, 25, 853-873. 2001.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p.248-254. 1976.
- BREMNER, I. Nutritional and physiologic significance of metallothionein. **Methods in Enzimology**. v.205, p.25-35. 1991.
- BUNGE, Mario. **Epistemologia**. São Paulo: EDUSP, 1980.
- BURDEN, V. M.; SANDHEINRICH, M. B.; CALDWELL, C. A. Effects of lead on growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**. v.101, p.285-289. 1998.
- BRASIL. Resolução do CONAMA nº. 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.72-89. 30 jun., 1986.
- CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 55, p. 116–125. 2003.
- CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 52, 83-91. 2002.
- CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ALVES COSTA, J. R. M.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damages induced by trophic doses of lead evaluated by comet assay and chromosomal aberrations in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, i. 2, p. 270-274. 2004.
- CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo : Relatórios anuais CETESB, 1978-97
- CHEN, C. et al. Accumulation of mercury, selenium and their binding proteins in porcine kidney and liver from mercury-exposed areas with the investigation of their redox responses. **Science of the Total Environment, in press**. 2006.
- CHOWDHURY, M. J., MCDONALD, D. G., WOOD, C. C. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. **Aquat. Toxicol.**, 69, 149-163. 2004.
- DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; WRIGHT, L. S.; KORNGUTH, S. E.; SIEGEL, F. L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology**, v. 128, p. 191-206. 1998.
- DEMASI, M.; PENATTI, C. A. A., DELUCIA, R., BECHARA, E. J. H. The prooxidant effect of δ -aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. **Free Radical Bio. Med.**, v. 20, n. 3, p. 291-299. 1996.

- DIMITROVA, M. ST.; TISHINOVA, V.; VELCHEVA, V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.** v.108C, n.1, p.43-46. 1994.
- EATON, D. L. E. CHERIAN, M. G. Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay. **Methods in Enzimology.** v.205, p.83-88. 1991.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES JR, V., FEATHRSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p.88-95. 1961.
- ERK, M.; IVANKOVIC, D.; RASPOR, B.; PAVICIC, J. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**, v. 57, p. 1211–1218. 2002.
- FARINA, M.; BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and δ -aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. **Toxicology**, v. 184, p. 179-187. 2003.
- FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S. M.; RANDI, M. A. F.; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Hepatocytes primary culture from the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Journal of Fish Biology**, no prelo. 2006.
- GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of δ -aminolaevulic acid dehydrase. **Biochemistry.** v.61, p.618-29. 1955.
- GILL, T. S., PANT, J. C. Hematological and pathological effects of chromium in the freshwater fish *Barbus conchoni* Ham. **Water Air Soil Pollut.**, 35, 241-250. 1987.
- GORDON, D. A. et al. Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -ethynylestradiol in field mesocosms. **Environmental Pollution, in press.** 2006.
- GOYER, R. A., CLARKSON, T. W. **Toxic effects of metals.** In: KLAASSEN, C. D. (Ed.), Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, USA, p. 830. 2001.
- GURER-ORHAN, H.; SABÝR, H. U.; ÖZGÜNES, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, v. 195, p. 147–154. 2004.
- HALL, T. A. **BioEdit sequence alignment editor v.5.0.9.** North Carolina State University, c1997-2001. 1 CD (197 Mb). Ambiente operacional do Windows 95/98/NT/XP.
- HARDIG, J. HOGLUND, L.B. Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione content in the blood of reared Baltic salmon. **Comp. Biochem. Physiol.**, 75, 27-34. 1983.
- HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology.** 2ed. Boca Raton : CRC, 1995.
- HINCK, J. E. et al. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. **Science of the Total Environment, in press.** 2006.

HODSON, P. V. δ -Amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead. ***Journal Fisheries Research Board of Canada***. v.33, 268-271. 1976.

HODSON, P. V.; BLUNT, B. R.; SPRY, D. J.; AUSTEN, K. Evaluation of erythrocyte δ -amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. ***Journal Fisheries Research Board of Canada***. v.34, p.501-08. 1977.

HODSON, P. V.; BLUNT, B. R.; WHITTLE, D. M. *Monitoring lead exposure of fish*. In; CAIRNS, V. W.; HODSON, P. V.; NRIAGU, J. O (Eds.). ***Offprints from contaminant effects on fisheries***. [s.l.] : John Wiley e Sons, 1984. p.88-98.

HOLBECH, H. et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). ***Comparative Biochemistry and Physiology***, Part C, v. 130, p. 119-131. 2001.

HOUSTON, A. ***Blood and circulation***. In: SCHRECK, C.; MOYLE, P. (Eds.). ***Methods for fish biology***. Bethesda: AFS, 1990.

HOUSTON, A. et al. Changes in erythron organization during prolonged cadmium exposure: an indicator of heavy metal stress? ***Can. J. Fish. Aquat. Sci.***, v. 50, p. 17. 1993.

HWANG, UN-GI; KAGAWA, N.; MUGIYA, Y. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. ***General and Comparative Endocrinology***. v.119, p.69-76. 2000.

JOHANSSON-SJOBECK, M.; LARSSON, A. Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and haematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. ***Arch. Environ. Contam. Toxicol.***, v. 8, p. 419–431. 1979.

KÄGI, J. H. R. Overview of metallothionein. ***Methods in Enzymology***. v.205, p.613-626. 1991.

KENNEDY, J. H.; JOHNSON, Z. B.; WISE, P. D.; JOHNSON, P. C. *Model aquatic ecosystems in ecotoxicological research: considerations of design, implementation and analysis*. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). ***Handbook of ecotoxicology***. Boca Raton : LEWIS, 1995. cap.7.

KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. ***The Science of the Total Environment***. v.225, p.3-11. 1999.

KLING, P. G.; OLSSON, P. E. Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 cells. ***Free Radical Biology & Medicine***. v.28, n.11, p.1628-37. 2000.

KONDOH, M.; INOUE, Y.; ATAGI, S.; FUTAKAWA, N.; HIGASHIMOTO, M.; SATO, M. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress ***Life Sciences***, v. 69, p. 2137–2146. 2001.

KORDES, C.; RIEBER, E. P.; GUTZEIT, H. O. An in vitro vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*) ***Aquatic Toxicology***, v. 58, p. 151–164. 2002.

LABADIE, P.; BUDZINSKI, H. Alteration of steroid hormone profile in juvenile turbot (*Psetta maxima*) as a consequence of short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol. ***Chemosphere, in press***. 2006.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **22**, 680–685. 1970.
- LANDIS, W. G.; YU, MING-HO. *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. Boca Raton : LEWIS, 1995.
- LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 131, Part C, p 231–243. 2002.
- LATONNELLE, K.; MENN, F. L.; KAUSHIK, S. J.; BENNETAU-PELISSERO, C. Effects of dietary phytoestrogens *in vivo* and *in vitro* in rainbow trout and siberian sturgeon: interests and limits of the *in vitro* studies of interspecies differences. *General and Comparative Endocrinology*, 126, 39–51. 2002.
- LAZIER, C. B.; LANGLEY, S.; RAMSEY, N. B.; WRIGHT, J. M. Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*. v.104, p.321-329. 1996.
- LEMOS, P. M. M. *Estudos citogenéticos básicos e efeitos do chumbo no complexo cariotípico de Hoplias aff. malabaricus (Pisces, Characiformes, Erythrinidae)*. Curitiba : [s.n.], 2000. Monografia de conclusão de bacharelado em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- LERMEN, C. L., LAPPE, R., CRESTANI, M., VIEIRA, V. P., GIODA, C. R., SCHETINGER, M. R. C., BALDISSERETTO, B., MORAES, G., MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 239, 497-507, 2004.
- LIM, C., KLESIUS, P. H., LI, M. H., ROBINSON, E. H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185, 313-327. 2000.
- LIMKE, T. L., HEIDEMANN, S. R., ATCHISON, W. D. Disruption of intraneuronal divalent action regulation by methylmercury: Are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *Neurotoxicology*, 25,741–760. 2004.
- LIU, J., LIU, Y., HABEEBU, S. S., KLAASSEN, C. D. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic DcCl₂ exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 159(2), 98-108. 1999.
- LOHNER, T. W., REASH, R. J., WILLET, V. E., ROSE, L. A. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis sp.*) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 50, 203-216. 2001.
- LOPEZ, P. A.; FENOCCHIO, A. S. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Gill, 1903) (Characiformes). *Cytobios*, v.80, 217-221, 1994.
- LOUREIRO, V. E. *Dieta e atividade alimentar de Hoplias malabaricus (Bloch,1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (XI. : 1995 : Campinas). *Resumos*. Campinas : PUC, 6-10 fev., 1995. L4, p.12.
- LOWE-McCONNELL, R. H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes Neotropicais*. São Paulo: EDUSP, 1999.

- MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 7.ed. Boca Raton : LEWIS, 2000.
- MARTIN, L. K.; BLACK, M. C. Biomarker assessment of the effects of petroleum refinery contamination on channel catfish. **Ecotoxicology and Environ-mental Safety**. v.33, p.81-87. 1996.
- MARTIN, L. K.; BLACK, M. C. Biomarker assessment of the effects of coal strip-mine contamination on channel catfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.41, p.307-320. 1998.
- MASSARO, E. J. **Pharmacokinetics of toxic elements in rainbow trout**. U.S. Environmental Protection Agency - Ecological Research Series, EPA-660/3-74-027, Washington DC, 1974.
- MATHEWS, C. K.; HOLDE, K. E. van. **Biochemistry**. Redwood City : Benjamin/Cummings, 1990.
- MATSUBARA, T.; OHKUBO, N.; ANDOH, T.; SULLIVAN, C. V.; HARA, A. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. **Developmental Biology**. v.213, p.18-32. 1999.
- MATTSSON, K., LEHTINEN, D.-J., TANA, J., HARDG, J., KUKKONEN, J., NAKARI, T., ENGSTROM, C. Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 49,144-154. 2001.
- MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. *Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish*. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B (Eds.). **Fish ecophysiology**. New York : Chapman e Hall, 1993. p.297-321.
- MELANCON, M. J. *Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring*. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton : LEWIS, 1995. p.220-40.
- MELLANEN, P.; SOIMASUO, M.; HOLMBOM, B.; OIKARI, A.; SANTTI, R. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) exposed to effluents from pulp and paper mills. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.43, p.133-137. 1999.
- MIKAWA, N. et al. Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger (Conger myriaster) and vitellogenin gene expression during ovarian development. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, in press**. 2006.
- MONCAUT, N.; NOSTRO, F.; MAGGESE, M. C. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, v. 63, p. 127-137. 2003.
- MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; ARCURI, A. S.; BECHARA, E. J. H. Oxygen toxicity related to exposure to lead. **Clin. Chem.** v.31, n.10, p.1673-76. 1985.
- MONTEVERDI, G. H.; DI GIULIO, R. T. Vitellogenin association and oocytic accumulation of thyroxine and 3,5,3-triiodothyronine in gravid *Fundulus heteroclitus*. **General and Comparative Endocrinology**. v.120, p.198-211. 2000.
- MORAES, Roberto Padula de. **Transporte de chumbo e metais associados no Rio Ribeira de Iguape, São Paulo, Brasil**. Campinas : [s.n.], 1997. Dissertação de mestrado, INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNICAMP.

MOSCONI, G.; CARNEVALI, O.; CARLETTA, R.; NABISSI, M.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **General and Comparative Endocrinology**, v.110, p.252-261. 1998.

MUGIYA, Y.; TANAHASHI, A. Inhibitory effects of aluminium on vitellogenin induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v.109, p.37-43. 1998.

NCBI. **ENTREZ PROTEIN SEARCH**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein> > Acesso em: 05 fev. 2006.

NAVAS, J. M.; SEGNER, H. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 138, p. 285–298. 2001.

NICHOLLS, D. McE.; TEICHERT-KULISZEWSKA, K.; GIRGIS, G. R. Effect of chronic Hg chloride exposure on liver and muscle enzymes in fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 94C, n.1, p.265-270. 1989.

NOGUEIRA, C. W.; SOARES, F. A.; NASCIMENTO, P. C.; MULLER, D.; ROCHA J. B. T. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase. **Toxicology**, v. 184, p. 85-95. 2003.

OGUNSEITAN, O. A.; YANG, S.; ERICSON J. Microbial δ -aminolevulinate dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1899–1906. 2000.

OKADA, E. D.; GREGORIS, J.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. *Diagnóstico da pesca profissional em dois reservatórios do rio Iguaçu*. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C (Eds.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá : EDUEM, 1997. cap.16.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., ROULEAU, C., PELLETIER, E., TJALVE, H., AUDET, C. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic Char (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Sci. Tech.**, v.33, p.902 – 907, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research**, v.83, p.286-292. 2000.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research**, v. 90, p. 217-225. 2002a.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, 161-167. 2002b.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; PELLETIER, E. Hematological Findings in Neotropical Fish *Hoplias malabaricus* Exposed to Subchronic and Dietary Doses of Methylmercury, Inorganic Lead and Tributyltin Chloride. **Environmental Research**, *in press*. 2006.

OLIVER, J. R.; JIANG, S.; CHERIAN, M. G. Augmented hepatic injury followed by impaired regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after treatment with thioacetamide. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, v. 210, p. 190–199. 2006.

OOST, Ron van der; Jonny BEYER; Nico P. E. VERMEULEN. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v. 13, p. 57–149. 2003.

PALACE, V. P.; MAJEWSKI, H. S.; KLAVERKAMP, J. F. Interactions among antioxidant defenses in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 156. 1993.

PAIN, D. J. *Lead in the environment*. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). ***Handbook of ecotoxicology***. Boca Raton : LEWIS, 1995. p.356-91.

PEIXOTO, N. C.; ROZA, T.; FLORES, E. M. M.; PEREIRA, M. E. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. ***Toxicology Letters***, v. 146, p. 17–25. 2003.

PEIXOTO, N. C.; ROZA, T.; PEREIRA, M. E. Sensitivity of δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals *in vitro* depends on the stage of postnatal growth and tissue. ***Toxicology in Vitro*** (2004).

PELISSERO, C., FLOURIOT, G., FOUCHER, J. L., BENNETAU, B., DUNOGUES, J., LEGAC, F., SUMPTER, J. P. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: An *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. ***J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*** v. 44, p. 263–272. 1993.

PEROTTONI, J.; LOBATO, L. P.; SILVEIRA, A.; ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T. Effects of mercury and selenite on d-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. ***Environmental Research***, v. 95, p. 166–173. 2004a

PEROTTONI, J.; RODRIGUES, O. E. D.; PAIXÃO, M. W.; ZENI, Z; LOBATO, L. P.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 42, p. 17–28. 2004b

PETERS, L. D.; DOYOTTE, A.; MITCHELMORE, C. L.; MCEVOY, J.; LIVINGSTONE, D. R. Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. ***The Science of the Total Environment***, v. 279, p. 137-150. 2001.

PETRIVALSKY, M.; MACHALA, M.; NEZVEDA, K.; PIACKA, V.; SVOBODOVÁ, Z.; DRABEK, P. Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biochemical markers of chemical stress. ***Env. Tox. Chem.*** v.16, n.7, p.1417-21. 1997.

PLUMMER, J. L.; SMITH, B. R.; SIES, H.; BEND, J. R. Chemical depletion of glutathione *in vivo*. ***Methods in Enzimology***. v.77, p.50-59. 1991.

RIOS, F. S.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. ***Journal of Fish Biology***, 61, 85–95. 2002.

RIOS, F. S.; OBA, E. T.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the notropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). ***Comparative Biochemistry and Physiology***, v. 140, Part A, p 281–287. 2005.

- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. *Reproductive endocrinology*. In: EVANS, D. H (Ed.). ***The physiology of fishes***. Boca Raton : CRC, 1993. cap.16.
- RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 60, p. 147–156. 2005.
- RADICE, S.; FUMAGALLI, R.; CHIESARA, E.; FERRARIS, M.; FRIGERIO, S.; MARABINI, L. Estrogenic activity of procymidone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes: a possible mechanism of action ***Chemico-Biological Interactions***, 147, 185–193. 2004.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., SOUZA, A. T. S., PAVANELLI, G. C., TAKEMOTO, R. M., EIRAS, A. C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of upper Paraná river, Brazil. ***Acta Scient.***, 22 (2), 507-513. 2000.
- REGOLI, F.; PELLEGRINI, D.; WINSTON, G. W.; GORBI, S.; GIULIANI, S.; VIRNO-LAMBERTI, C.; STEFANO BOMPADRE, S. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). ***Marine Pollution Bulletin***, v. 44, p. 912–922. 2002.
- REIS-HENRIQUES, M. A.; CRUZ, M. M.; PEREIRA, J. O. The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of estradiol-17b by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary. ***Fish Physiol. Biochem.*** v.16, p.181-86. 1997.
- REIS-HENRIQUES, M. A.; FERREIRA, M.; SILVA, L.; DIAS, A. Evidence for an Involvement of Vitellogenin in the Steroidogenic Activity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Vitellogenic Oocytes. ***General and Comparative Endocrinology***. v.117, p.260-67. 2000.
- REMPEL, M. A. et al. Evaluation of relationships between reproductive metrics, gender and vitellogenin expression in demersal flatfish collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA. ***Aquatic Toxicology, in press***. 2006.
- ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. Effect of treatment mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. ***Toxicology***, v. 100, p. 27-37. 1995.
- RODRIGUES, A. L. S. ***δ -aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) em sangue de Pimelodus maculatus (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados***. Porto Alegre : [s.n.], 1987. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SCHEUHAMMER, A. M.; CHERIAN, M. G. Quantification of metallothionein by silver saturation. ***Methods in Enzymology***. v.205, p.78-83. 1991.
- SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to coppersulphate. ***Aquaculture***. v.177, p.367-379. 1999
- SHI, C. Metallothionein as a scavenger of free radicals. ***Trace Elem. Med.*** v.7, p.48. 1990
- SILVERSAND, C.; HYLLNER, S. J. E HAUX, C. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. ***The Journal of Experimental Zoology***, v.267, p.587-597. 1993.

- SINGH, H. S., REDDY, T. V. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry and hepatosomatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 20, 30-35. 1990.
- SMEETS, J. M. W.; RANKOUHI, T. R.; NICHOLS, K. M.; KOMEN, H.; KAMINSKI, N. E.; GIESY, J. P.; VAN DEN BERG, M. *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.157, p.68-76. 1999.
- SPANÒ, L. et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*) **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 369–379. 2004.
- STIEN, X.; RISSO, C.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEO, M.; LAFAURIE, M. Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. **Env. Tox. Chem.** v.16, n.2, p.214-19. 1997.
- STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio. Med.* v. 18, n. 2. 1995. p. 321-336.
- SUNTRES, Z.; LUI, E. M. K. Prooxidative effect of copper–metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cells. **Toxicology**, 217, 155–168. 2006.
- SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. *Reprodução de peixes do reservatório de Segredo*. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C (Eds.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá : EDUEM, 1997. cap.9.
- TEMPLETON, D. M.; CHERIAN, M. G. Toxicological significance of metallothionein. **Methods in Enzimology**. v.205, p.11-24. 1991.
- TEWARI, H.; GILL, T.; PANT, J. Impact of chronic lead poisoning on the hematological and biochemical profiles of fish, *Barbus conchoniensis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 38, 748, 1987.
- THIER, R. et al. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicology Letters**, v.140-/141, p. 75-81. 2003.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T.J. **ClustalW v. 1.4**: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. EBI, Hinxton, 1994. Integra o BioEdit v.5.0.9 (menu *accessory application*). In: HALL, T. A. BioEdit v.5.0.9. North Carolina State University, c1997-2001. 1 CD (197 Mb). Ambiente operacional do Windows 95/98/NT/XP.
- THOMPSON, E. D.; MAYER, G. D.; BALESARIA, S.; GLOVER, C. N.; WALSH, P. J.; HOGSTRAND, C. Physiology and endocrinology of zinc accumulation during the female squirrelfish reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 2003.
- TOM, M.; JAKUBOV, E.; RINKEVICH, B.; HERUT, B. Monitoring of hepatic metallothionein mrna levels in the fish lithognathus mormyrus ± evaluation of transition metal pollution in a mediterranean coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 503-508. 1999.
- VALLEE, B. L. Introduction to metallothionein. **Methods in Enzimology**. v.205, p.3-7. 1991.
- VASAK, M.; HASLER, D. W. Metallothioneins: new functional and structural insights. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.4, p.177-83. 2000.

- VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., & FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, v. 44, n. 1, p. 69-84. 1997.
- VIARENGO, A.; LAFAURIE, M.; GABRIELIDES, G. P.; FABBRI, R.; MARRO, A.; ROMÉO, M. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Marine Environmental Research*, v. 49, p. 1-18. 2000.
- VIGHI, M. Lead uptake and release in a experimental trophic chain. *Ecotoxicology and environmental safety*. v.5, p.177-93. 1981.
- WEDEMEYER, G. A., BARTON, B. A., MCLEAY, D. J. *Stress and acclimation*. In Methods for Fish Biology (Schreck; CB and Moyle, PB, eds), pp. 451-489. Bethesda, MD: American Fisheries Society. 1990.
- WERNER, J. et al. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquatic Toxicology*, v. 62, p. 321-328. 2003.
- WESTERLUND, L.; HYLLNER, S. J.; SCHOPEN, A.; OLSSON, P. E. Expression of three vitelline envelope protein genes in arctic char. *General and Comparative Endocrinology*. v.122, p.78-87. 2001.
- WRIGHT, J.; GEORGE, S.; MARTINEZ-LARA, E.; CARPENE, E.; KINDT, M. Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. *Marine Environmental Research*, 50, 503-508. 2000.
- ZHONG, X. et al. The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an in vivo model for endocrine disruption in freshwater teleosts: a full life-cycle test with diethylstilbestrol. *Aquatic Toxicology*, v. 71, p. 85–95. 2005.

APÊNDICE 1

PROTOCOLO EMPREGADO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA δ -ALAd ERITROCITÁRIA

aferição de **porfobilinogênio** (ATIVIDADE DA δ -ALAD) em amostras biológicas (**tecidos**)

PRINCÍPIO (CATÁLISE DA δ -ALAD): δ -ALA + δ -ALA = PBG

PBG + ABA = COR RÓSEA

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO (TFS: pH 6,3 - 6,5)	
					FOSFATO MONOBÁSICO (MONOSÓDICO)	SOLUÇÃO F1
1 L	0,2 M	\\	\\	27,6000	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MM = 138,00 g/mol)	
1 L	0,2 M	\\	\\	31,2000	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MM = 156,00 g/mol)	

>> ESTOCAR a 4°C

					FOSFATO DIBÁSICO (DISÓDICO)	SOLUÇÃO F2
1 L	0,2 M	\\	\\	35,6000	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MM = 178,00 g/mol)	
1 L	0,2 M	\\	\\	53,6200	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MM = 268,10 g/mol)	
1 L	0,2 M	\\	\\	71,7000	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MM = 358,50 g/mol)	

>> ESTOCAR a 4°C

F1	título	F2	título	pH	>> MISTURAR F1 + F2 nas seguintes proporções para o pH desejado:
450 ml	90 %	50 ml	10 %	5,9	
425 ml	85 %	75 ml	15 %	6,1	
385 ml	77 %	115 ml	23 %	6,3	
340 ml	68 %	160 ml	32 %	6,5	
285 ml	57 %	215 ml	43 %	6,7	para 1 LITRO de TFS pH 6,3
225 ml	45 %	275 ml	55 %	6,9	
165 ml	33 %	335 ml	67 %	7,1	
115 ml	23 %	385 ml	77 %	7,3	
95 ml	19 %	405 ml	81 %	7,4	
80 ml	16 %	420 ml	84 %	7,5	para 1 LITRO de TFS pH 6,3
50 ml	10 %	450 ml	90 %	7,7	

>> ADICIONAR 400 ml de H_2O -DD

>> AFERIR e CORRIGIR o pH

>> AFERIR 1 LITRO

>> ESTOCAR a 4°C

HOMOGENATO TECIDUAL: RIM ou FÍGADO

>> ADICIONAR 2 ml de TFS para cada 1 g de tecido

>> homogeneizar em ALTA VELOCIDADE por 1 m.

>> CENTRIF: 5°C por 5 min a 10.000 xg

diluição do tecido em TFS: Burden 0,41
aqui 0,33

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	CITÓLISE e INCUBAÇÃO		
(0,275 ml x 100 poços) + 5 ml					Solução A : TRITON-X100 em TFS		FAZER NO DIA
35 ml	0,5 %	0,175 ml	100 %	\\	Triton-X100	2 PLACAS = 12 AMOSTRAS + CURVA PADRÃO PBG	
>> AFERIR 35 ml de TFS; TIRAR 175 µl e REPOR 175 µl de Triton							
					Solução de HgCl ₂ em TCA (TCA/Hg)		FAZER NO DIA
100 ml	\\	\\	\\	4,0000	TCA	40,00 mg.ml ⁻¹	PRECIPITA, DESNATURA E PARA A REAÇÃO
100 ml	\\	\\	\\	2,7000	HgCl ₂	27,00 mg.ml ⁻¹	
100 ml	99,45 mM	\\	\\	2,7000	HgCl ₂	(MM = 271,495 g/mol)	
>> USAR MÁSCARA E LUVA; PESAR NA CAPELA							
>> DILUIR com H ₂ O-DD NA CAPELA: com Δ°C e AGITAÇÃO							
0,275 ml x 60 poços = (5 réplicas) x (12 amostras)					Solução com o SUBSTRATO (δ-ALA)		FAZER NO DIA
20 ml	4,36 mM	\\	\\	0,0146	δ-ALA.HCl na Solução A	(MM = 167,592 g/mol)	
>> PESAR rapidamente, manipular sobre o GELO moído (0°C)							
RESULTANTES							
300 µl	4,00 mM	275 µl	4,36 mM	\\	[δ-ALA] na incubação (300 µl): 10,95 x k _M		
1000 µl	69,61 mM	700 µl	99,45 mM	\\	[HgCl ₂] resultante após a parada		
					REAGENTE DE EHRLICH (COR)		FAZER NO DIA
20 ml	\\	\\	\\	0,3636	p-dimetil-ABA	18,18 mg.ml ⁻¹	100 µl x 200 poços para 2 PLACAS: 12 AMOSTRAS + CURVA PADRÃO PBG
20 ml	\\	\\	\\	0,0636	HgCl ₂	3,18 mg.ml ⁻¹	
20 ml	\\	15,27 ml	\\	\\	Ácido Acético Gl.	0,76 título (v/v)	
20 ml	\\	3,64 ml	\\	\\	HClO ₄ a 70%	0,18 título (v/v)	
20 ml	\\	1,09 ml	\\	\\	H ₂ O-DD	0,05 título (v/v)	

PREPARAÇÃO DOS TUBOS COM AS AMOSTRAS (PIPETAGEM): 12 AMOSTRAS PARA 1 PLACA

3X BRANCO	5X AMOSTRA	PARA CADA AMOSTRA DE TECIDO (1 COLUNA DE PLACA) PIPETAR:
275 µl	\\	Solução A
\\	275 µl	Solução com o SUBSTRATO (δ -ALA)
25 µl	\\	AMOSTRA de TECIDO: sangue total (ST) ou sobrenadante do homogenato (SNH)
		>> pipetar nos BRANCOS antes: 1 a 1 até a parada da reação; VORTEXAR
700 µl	\\	Solução de TCA/Hg ; VORTEXAR os BRANCOS
\\	25 µl	AMOSTRA de TECIDO: ST ou SNH (tudo no GELO moído até aqui: 0°C)
		>> VORTEXAR tudo; INCUBAR a 37°C por 1 hora; PARAR REAÇÃO a 0°C (banho)
\\	700 µl	Solução de TCA/Hg ; VORTEXAR todos os tubos
		>> <i>overnight</i> opcional a 4°C (ler em até 24 horas após a parada da reação)
		>> VORTEXAR; CENTRIF: 5°C por 5 min a 10.000 xg
		>> <i>overnight</i> opcional a 4°C (ler em até 24 horas após a parada da reação)

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	CURVA DE REFERÊNCIA COM PADRÕES DE PBG	
Solução MÃE de PBG (SM~PBG)					FAZER NO DIA	
1000 μ l	\\	\\	\\	0,0010	PBG	1000 μ g.ml ⁻¹
0,001 L	4420,28 μ M	\\	\\	\\	PBG	(MM = 226,23 g/mol)

>> DILUIR com a Solução A

TABELA DE CONFEÇÃO DOS PADRÕES DE PBG (FAZER NO DIA)					>> preparar os volumes tabelados ao lado em 12 tubos de 1,5 ml					
PBG em sol. A	Solução A	TCA/Hg (µl)	[PBG] (µg.ml ⁻¹)	µM	>> usar o padrão de PBG 0 µM como BRANCO					
150 µl	150 µl	700	150	663,042	REAÇÃO DE COR na MICROPLACA <table border="1"><tr><td>[PBG]</td><td>EHRLICH</td></tr><tr><td>100 µl</td><td>100 µl</td></tr></table> após EXATOS 15 MINUTOS		[PBG]	EHRLICH	100 µl	100 µl
[PBG]	EHRLICH									
100 µl	100 µl									
100 µl	200 µl	700	100	442,028						
75 µl	225 µl	700	75	331,521						
50 µl	250 µl	700	50	221,014						
35 µl	265 µl	700	35	154,710	>>> LER a 550 nm (200 µl na microplaca)					
30 µl	270 µl	700	30	132,608						
25 µl	275 µl	700	25	110,507						
20 µl	280 µl	700	20	88,406						
15 µl	285 µl	700	15	66,304						
10 µl	290 µl	700	10	44,203						
5 µl	295 µl	700	5	22,101						
0 µl	300 µl	700	0	0,000						
515 µl	3,09 ml	8,40	TOTAL (ml)							

APÊNDICE 2

PROTOCOLO EMPREGADO PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DA METALOTIONEÍNA EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES

QUANTIFICAÇÃO DE CISTEÍNAS (-SH) QUE INTEGRAM A METALOTIONEÍNA DE TECIDOS

p.1

demanda: 12 AMOSTRAS DE TECIDO/ÓRGÃO = CENTRÍFUGA REFRIGERADA para 24 ependorfes (EPNDFs)

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E HOMOGENEIZAÇÃO	
Solução Estoque de PMSF						
100 ml	200 mM	\\	\\	3,4840	PMSF (MM = 174,20 g/mol)	FAZER ANTES
>>> diluir em etanol ou metanol absolutos						
>>> estocar em RECIPIENTE DE PLÁSTICO a -20°C						
Tampão de Homogeneização (TH; pH = 8,6)						
300 l	500 mM	\\	\\	51,3450	sacarose (MM = 342,30 g/mol)	FAZER NO DIA
300 l	20 mM	\\	\\	0,7266	Tris-HCl (MM = 121,10 g/mol)	
>>> ajustar pH 8,6 com 250 ml						
>>> completar 300 ml						
>>> reservar 6 ml para solução de lavagem (SL)						
>>> acrescentar protetores NA HORA e USAR EM 1 HORA NO MÁXIMO:						
294 ml	0,01 %	29,4 µl	100 %	\\	β-mercaptoetanol	>> agente redutor: impede oxidação (-S-S-)
294 ml	0,5 mM	735 µl	200 mM	\\	PMSF alcólico	>> anti-proteolítico

20 ml por amostra do tecido/órgão

e + 10 ml para lavagem de cada amostra

20 ml por amostra do tecido/órgão
e + 10 ml para lavagem de cada amostra

TE - tubo de ensaio

EPNDF - tubos de 1,5 a 2,0 ml
com tampa
do tipo "ependorfe"

1 EPNDF / amostra

- > USAR amostras de tecido/órgão com até 3,5 cm³ (para tubo de homogeneização de 15 ml)
- > PESAR AMOSTRAS : MANTER PADRÃO (massas aproximadas entre amostras)
- > LAVAR amostras em TH (10 ml), por 1 min., a 0-4°C
- > DESPREZAR TH da lavagem
- > AFERIR volume da amostra (V_A) em PROVETA (já com um pouco de TH)
- > ACRESCENTAR exatamente $3 \times V_A$ (figado) com TH (anotar para cálculo da densidade da amostra):
por $2 \times V_A$ de TH na proveta (ACRESCENTAR $4 \times V_A$ para brânquias)
transferir para o tubo de homogeneização lavando a proveta com o $1 \times V_A$ restante
- > HOMOGENEIZAR amostras com velocidade máxima por 2 min. ininterruptos
transferir 1,5 ml de HOMOGENATO para 1 EPNDF
- > CENTRIFUGAR para obter o sobrenadante (SN) com MT-SH
21 460 xg por 20 min., a 0-4°C

100 000 xg, 90': fração citosólica
30 000 xg, 20': SN com MT-SH

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	EXTRAÇÃO DE MT-SH	p.2
1 EPNDF / amostra		FRACIONAÇÃO ÁCIDA com ETANOL-CLOROFÓRMIO				
1065 µl	\\	500 µl	\\	\\	SN com MT-SH	FAZER NO DIA
1065 µl	49,296 %	525 µl	100 %	\\	etanol absoluto (-20°C)	
1065 µl	3,756 %	40 µl	100 %	\\	clorofórmio absoluto (-20°C)	
>>> VORTEXAR						
>>> centrifugar a 6000 xg por 10 min., a 0-4°C						
>>> transferir 900 µl do SN para 1 tubo de ensaio (TE)						
>>> acidificar com 20 µl de HCl (37%)						PRECIPITAÇÃO de PTS
1 TE / amostra		20 µl			[etanol] resultante	
920 µl	48,22 %	900 µl	49,296 %	\\	[etanol] resultante	
<div>[etanol] resultante</div> <div>$C_f = 87 \%$ $V_f = V_1 + V_2$</div> <div>$C_1 = 48,22 \%$ $V_1 = 920 \mu\text{l}$</div> <div>$C_2 = 100 \%$ $V_2 = 2744 \mu\text{l}$</div> <div>$(V_f).(C_f) = (V_1).(C_1) + (V_2).(C_2)$ $V_2 = (V_1) \cdot [(C_f - C_1) / (C_2 - C_f)]$</div>						
		2744 µl			>>> adicionar 3xV de etanol absoluto (-20°C) para $C_f = 87 \%$	
3664 µl	0,9 %	900 µl	3,756 %	\\	[clorofórmio] resultante	
>>> VORTEXAR; manter os TUBOS FECHADOS a -20°C por 1h; VORTEXAR						
>>> ALIQUOTAR MISTURANDO 2 x 1832 µl de cada TUBO em 2 EPNDFs de 2 ml						
>>> centrifugar a 6000 xg por 10 min., a 0-4°C						
>>> desprezar SN mantendo o PRECIPITADO (MT-SH) de cada EPNDF:						
>> OBTER o extrato etanólico com 1/2 de MT-SH da amostra: 1/2(EEMT)						
>>> RESSUSPENDER cada 1/2(EEMT) com 1000 µl de SL a 0-4°C						
>>> centrifugar a 6000 xg por 10 min., a 0-4°C						
>>> desprezar SN e SECAR (EPNDFs abertos) a temperatura ambiente (TA°C)						
>> secar excesso com tiras de papel filtro						
1/2(EEMT) = 1 PELLET = PRECIPITADO com MT-SH de 1 dos 2 EPNDFs / amostra						
Solução Estoque de NaCl						
100 ml	2,5 M	\\	\\	14,6106	NaCl aq. (MM = 58,44 g/mol)	FAZER ANTES

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	PREPARO para REAÇÃO DE COR: liberação dos grupos -SH			p.3
Soluções de NaCl e de HCl+EDTA								
10 ml	250 mM	1 ml	2500 mM		NaCl aq.	(MM = 58,44 g/mol)	FAZER NO DIA	
		150 µl	>>> RESSUSPENDER LAVANDO os 2 EEMT com 150 µl de NaCl					
1 TE / amostra		>> TRANSFERIR (JUNTAR) os 2 EEMT para 1 tubo de ensaio (TE)						
100 ml	1 N	8,28 ml	12,08 N	\\	HCl (37 %)	(MM = 36,45 g/mol)	FAZER ANTES	
\\	3,06 %	\\	37 %	\\		(d = 1,19 g/ml)		
100 ml	4 mM	\\	\\	0,1489	[Na ₂] [EDTA].2H ₂ O	(MM = 372,24 g/mol)		
		150 µl	>>> ACIDIFICAR o EEMT com 150 µl de EDTA+HCl (lavar EPNDFs)					
300 µl	125 mM	150 µl	250 mM	\\	[NaCl] resultante	>> desnaturação de MT-SH		
300 µl	0,5 N	150 µl	1 N	\\	[HCl] resultante	>> remoção de cátions metálicos dos -SH		
300 µl	2 mM	150 µl	4 mM	\\	[EDTA] resultante	>> seqüestro de cátions metálicos		
Solução estoque de DTNB tamponado (SE-DTNB)								
50 ml	200 mM	\\	\\	1,4196	Na ₂ HPO ₄ anidro	(MM = 141,96 g/mol)	FAZER ANTES	
50 ml	2 M	\\	\\	5,8443	NaCl	(MM = 58,44 g/mol)		
50 ml	8,6 mM	\\	\\	0,1704	DTNB	(MM = 396,30 g/mol)		
>>> aliquotar 25 x 2 ml e estocar a -20°C; descongelar no dia do uso a TA°C								
DTNB tamponado (pH = 8)								
100 ml	200 mM	\\	\\	2,8392	Na ₂ HPO ₄ anidro	(MM = 141,96 g/mol)	FAZER NO DIA	
100 ml	2 M	80 ml	2,5 M	\\	NaCl	>> estabilização do DTNB excedente		
100 ml	0,43 mM	5 ml	8,6 mM	\\	SE-DTNB			
>>> dissolver o Na ₂ HPO ₄ com 80 ml de NaCl 2,5 M; ajustar pH 8,0								
45 ml para a curva + 55 ml para 12 amostras e 1 branco				>>> completar 100 ml e manter a TA°C (dissolver cristais: ultra-som/agitação)				
REAÇÃO DE COR em TA°C (em poucos segundos, estável por horas)								
>>> transferência dos 4 EEMT ressuspensos para o TE: LAVAR BEM os 4 EPNDFs com os 150 µl de EDTA+HCl								
1 TE / amostra		>> OBTER o EEMT total da amostra, ressuspensão nos 300 µl de NaCl 125 mM, EDTA 2 mM em HCl 0,5 N						
REAÇÃO DE COR		>>> 300 µl de EEMT total ressuspensão				LER 1 BRANCO: 300 µl de NaCl 125 mM,		
		>>> 4200 µl de DTNB tamponado				EDTA a 2 mM em HCl 0,5 N		
>>> centrifugar a 3000 xg por 5 min. e LER o SN					>>> LER a 405 nm (200 µl na microplaca)			

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	CURVA DE REFERÊNCIA COM PADRÕES DE GSH	p.4
-------	-------	-------	-------	-------	--	-----

Solução Estoque de GSH (SE-GSH)

6 ml	10 mM	\\	\\	0,0184	GSH (MM = 307,30 g/mol)	FAZER ANTES
------	-------	----	----	--------	-------------------------	-------------

>>> dissolver com EDTA 4 mM em HCl 1 N; alíquotar 15 x 400 µl (-20°C)

300 µl	>> da SE-GSH
2700 µl	>> EDTA 4 mM em HCl 1 N

Padrões de GSH a partir de 1 mM (volumes tabelados abaixo)

>>> preparar **NO DIA** com a solução de EDTA+HCl usada nas amostras

>>> diluir 1:10 (v/v) com EDTA 4 mM em HCl 1 N

3 ml	1000 µM	0,300 ml	10000 µM	\\	GSH 1 mM com EDTA 4 mM em HCl 1 N	FAZER NO DIA
------	---------	----------	----------	----	-----------------------------------	--------------

P.Ex.: cálculo para padrão de GSH 120 µM

	entrada				GSH 120 µM com EDTA 2 mM em HCl 0,5 N	
1000 µl	120 µM	120 µl	1000 µM	\\	GSH 1000 µM com EDTA 4 mM em HCl 1 N	Vol. TABELADO

$V_f = 1000 \mu\text{l}$	$V_i = 120 \mu\text{l}$	$V_2 = 880 \mu\text{l}$		$(V_f) \cdot (C_f) = (V_i) \cdot (C_i) + (V_2) \cdot (C_2)$
$C_f = 0,5 \text{ N}$	$C_i = 1 \text{ N}$	$C_2 = 0,43 \text{ N}$	[HCl]	$C_2 = [(V_f \times C_f) - (V_i \times C_i)] / V_2$
$C_f = 2 \text{ mM}$	$C_i = 4 \text{ mM}$	$C_2 = 1,73 \text{ mM}$	[EDTA]	

" "	0,43 N	" "	1,0 N	[HCl]		
880 µl	1,73 mM	380 µl	4,0 mM	[EDTA]	EDTA 4 mM em HCl 1 N	Volume TABELADO
\\	\\	500 µl	\\	\\	H ₂ O	Volume TABELADO

TABELA para os PADRÕES DE GSH (fazer NO DIA; EPNDFs)

REAÇÃO DE COR (TE)

GSH 1000 µM	EDTA 4 mM em HCl 1 N	H ₂ O	[GSH] (µM)	[GSH]	DTNB-T
500 µl	0 µl	500	500	300 µl	4200 µl
300 µl	200 µl	500	300	>> 1 reação em tubo de vidro para cada [GSH]	
240 µl	260 µl	500	240	>> usar o padrão de GSH 0 µM como BRANCO	
180 µl	320 µl	500	180	>>> LER a 405 nm (200 µl na microplaca)	
120 µl	380 µl	500	120	VOLUME TOTAL USADO	
90 µl	410 µl	500	90	EDTA 4 mM em HCl 1 N	3,465 ml
60 µl	440 µl	500	60	GSH 1000 µM	1,535 ml
30 µl	470 µl	500	30	direto no TE:	
15 µl	485 µl	500	15	+ 225 µl (+75 µl EDTA+HCl) para [GSH] = 750 µM	
0 µl	500 µl	500	0	+ 300 µl para [GSH] = 1000 µM	

APÊNDICE 3

PROTOCOLO EMPREGADO PARA O ISOLAMENTO DA VTG PLASMÁTICA POR PRECIPITAÇÃO

ISOLAMENTO ou PURIFICAÇÃO PARCIAL da VTG método de:

Wiley, H. S.; Opresco, L. e Wallace, R. A. New methods for purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.*, v.97, p.145-152, 1979.

adaptado para de TELEÓSTEOS por:

Silversand, C.; Hyllner, S. J. e Haux, C. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts

The Journal of Experimental Zoology, v.267, p.587-597, 1993.

V _f	C _f	V _i	C _i	m (g)	OBTENÇÃO de PLASMA
					<u>Solução Estoque de PMSF</u>
0,100 l	0,2 M	\\	\\	3,4840	PMSF (MM = 174,20 g/mol)
					>>> DILUIR em etanol ou metanol absolutos
					>>> ESTOCAR em RECIPIENTE PLÁSTICO a -20°C
					<u>Solução Anti-Proteolítica (SAP) para coleta de plasma</u>
10 ml	10 mM	0,500 ml	200 mM	\\	PMSF
10 ml	10 %	\\	\\	0,0000	aprotinina (MM = g/mol)
					>>> DISSOLVER em 25 ml com salina (NaCl a 0,9 %)
10 ml	5,0 %	0,500 ml	100 %	\\	[etanol] ou [metanol] resultante
					>>> ADICIONAR sangue total (ST) em tubos de 1,5 ml contendo SAP
					na diluição 1:10 (v/v de SAP : ST+SAP)
10	1,00 mM	1	10 mM	\\	[PMSF] resultante
10	1,00 %	1	10 %	\\	[aprotinina] resultante
10	0,50 %	1	5,0 %	\\	[etanol] ou [metanol] resultante
MANUSEAR o SANGUE e o PLASMA SEMPRE a 4°C					>>> CENTRIF a 4°C por 30 min a 3000 xg
ALÍQUOTA de plasma: SDS-PAGE, seguida ou não de <i>immunoblot</i> 0,1 a 0,4 µl diluídos 50X em TDA (tampão de desnaturação da amostra) > adicionar 1 µl de plasma em 49 µl de TDA > ferver e APLICAR 5 a 20 µl, por linha de gel > rotular e guardar o restante a 4°C					>>> ALIQUOTAR, CONGELAR em N ₂ líq. e ESTOCAR o PLASMA a -80°C
					MgO (s) + HCl (aq) <<< >>> MgCl ₂ (aq) + H ₂ O (l)

V _f	C _f	V _i	C _i	m (g)	ISOLAMENTO da VTG por PRECIPITAÇÃO / LAVAGEM	
Solução de EDTA (pH 7,7)						
100 ml	20 mM	\\	\\	0,7445	[Na ₂] [EDTA].2H ₂ O (MM = 372,24 g/mol)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O
>>> AJUSTAR pH 7,7 com 90 ml e AFERIR 100 ml						
0,100 < V _P (ml) < 1,000 :		0,5 ml	>>> DILUIR 5X o volume obtido de PLASMA (V _P) com EDTA 20 mM (pH 7,7)			
2,5 ml	16 mM	2,0 ml	20 mM	\\	[EDTA] resultante	1 : 5 = (v/v) = V _P : V _P +V _{EDTA}
5X		500 µl	>>> MISTURAR por inversão; DIVIDIR o volume obtido em 5 TUBOS			
Solução de MgCl ₂ >> PRECIPITAÇÃO da VTG						
100 ml	500 mM	\\	\\	4,7605	MgCl ₂ aq. (MM = 95,21 g/mol)	
>>> PRECIPITAR a VTG de cada tubo com 5 VOLUMES de MgCl ₂ 500 mM						
Para cada sp de peixe, escolher (SDS-PAGE) 1 das 5 diluições de MgCl ₂					para obtenção das seguintes RAZÕES MOLARES:	
540 µl	14,8148 mM	500 µl	16 mM	[EDTA] resultante	1,0	[EDTA] : [Mg ⁺⁺] = 1,0 : 2,5
540 µl	37,037 mM	40 µl	500 mM	[MgCl ₂] resultante	2,5	
532 µl	15,0376 mM	500 µl	16 mM	[EDTA] resultante	1,0	[EDTA] : [Mg ⁺⁺] = 1,0 : 2,0
532 µl	30,0752 mM	32 µl	500 mM	[MgCl ₂] resultante	2,0	
524 µl	15,2672 mM	500 µl	16 mM	[EDTA] resultante	1,0	[EDTA] : [Mg ⁺⁺] = 1,0 : 1,5
524 µl	22,9008 mM	24 µl	500 mM	[MgCl ₂] resultante	1,5	
516 µl	15,5039 mM	500 µl	16 mM	[EDTA] resultante	1,0	[EDTA] : [Mg ⁺⁺] = 1,0 : 1,0
516 µl	15,5039 mM	16 µl	500 mM	[MgCl ₂] resultante	1,0	
508 µl	15,748 mM	500 µl	16 mM	[EDTA] resultante	1,0	[EDTA] : [Mg ⁺⁺] = 1,0 : 0,5
508 µl	7,87402 mM	8 µl	500 mM	[MgCl ₂] resultante	0,5	
>>> CENTRIF a 4°C por 15 min a 5000 ×g; DESPREZAR o sobrenadante						
Solução de NaCl						
100 ml	1 M	\\	\\	5,8443	NaCl aq. (MM = 58,44 g/mol)	
50 µl de NaCl 1 M para REDISSOLVER o <i>pellet</i> (nas 2X)					>>> REDISSOLVER o <i>pellet</i> em NaCl 1 M; PRECIPITAR a VTG com de H ₂ O	
1000 µl de H ₂ O-D ADICIONADOS para REPRECIPITAR					>>> CENTRIF a 4°C por 15 min a 5000 ×g; REDISSOLVER em NaCl 1 M	

APÊNDICE 4

PROTOCOLO EMPREGADO PARA *SDS-PAGE*, *WESTERN BLOTTING* E IMUNO-DETECÇÃO

V _f	C _f	V _i	C _i	m (g)	SDS-PAGE para VTG		
Solução Estoque de ACRILAMIDA (ACRYL)							
100 ml	0,80 %	\\	\\	0,8000	BISACRYL	1,00	(MM = 154,17 g/mol)
100 ml	30,00 %	\\	\\	30,0000	ACRYL	37,50	(MM = 71,08 g/mol)
1,08449	31,48 %				>>> pesar sob capela e com proteção, sem nenhum contato ou inalação		
Solução Estoque de SDS (10 %)							
100 ml	10 %	\\	\\	10,0000	SDS		
>>> pesar sob capela e com proteção, sem nenhum contato ou inalação							
Solução Estoque de persulfato de amônio (APS)							
10 ml	10 %	\\	\\	1,0000	APS		
>>> ALIQUOTAR (> 60 µl) e CONGELAR a -20°C							
Solução Tampão de Eletroforese (STE)							pH 8,3
700 ml	25 mM	\\	\\	2,1199	Tris-BASE	(MM = 121,14 g/mol)	
700 ml	192 mM	\\	\\	10,0894	GLICINA	(MM = 75,07 g/mol)	
700 ml	0,1 %	7 ml	10 %	\\	SDS		
>>> AJUSTAR o pH do STE em 400 ml e AFERIR 500 ml							
Solução Corante com Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250)							
300 ml	0,1 %	\\	\\	0,3000	CBB R-250		
300 ml	45 %	135 ml	100 %	\\	Met-OH	Descorar com Et-OH 27,5 % e AAG 7,5 %	
300 ml	10 %	30 ml	100 %	\\	AAG		
>>> FILTRAR e ESTOCAR no ESCURO a TA°C							
UPPER GEL BUFFER (UGB)							pH 6,8
50 ml	0,5 M	\\	\\	3,0285	Tris-HCl	(MM = 121,14 g/mol)	
LOWER GEL BUFFER (LGB)							pH 8,8
50 ml	1,5 M	\\	\\	9,0855	Tris-HCl	(MM = 121,14 g/mol)	

V _f	C _f	V _i	C _i	m (g)	SDS-PAGE para VTG (cont.)	
2 x					Tampão de Desnaturação da Amostra (TDA 2X)	pH 6,8
8 ml	125 mM	2,0 ml	500 mM	\\	Tris-HCl (UGB sem o SDS)	
8 ml	4 %	3,2 ml	10 %	\\	SDS	
8 ml	20 %	1,6 ml	99,5 %	\\	GLICEROL	
8 ml	10 %	0,8 ml	100 %	\\	β-mercaptoEt-OH	
8 ml	0,002 %	\\	\\	0,0002	Azul de bromo-fenol	
7,6 ml		0,4 ml	H ₂ O-DD	>>> ALIQUOTAR (50 x 1,0 ml) e CONGELAR a -20°C		
					PBS (2X)	pH 7,2
100 ml	280 mM	\\	\\	1,6364	NaCl (MM = 58,44 g/mol)	AJUSTAR o pH em 90 ml AFERIR 100 ml
100 ml	5,4 mM	\\	\\	0,0403	KCl (MM = 74,55 g/mol)	
100 ml	16 mM	\\	\\	0,2271	Na ₂ HPO ₄ (MM = 141,96 g/mol)	
100 ml	3 mM	\\	\\	0,0408	KH ₂ PO ₄ (MM = 136,09 g/mol)	
					UPPER GEL	pH 6,8
5 ml	125 mM	1250,0 µl	500 mM	\\	[Tris-HCl] resultante (UGB)	
5 ml	0,1 %	50,0 µl	10 %	\\	SDS	
5 ml	4 %	635,4 µl	31,48 %	\\	ACRYL	
5 ml	0,025 %	12,5 µl	10 %	\\	APS >> adicionar por último	
5 ml	0,025 %	1,3 µl	100 %	\\	TEMED >> adicionar por último	
1,949 ml		8050,8 µl	H ₂ O-DD	>>> POLIMERIZAR a TA°C		
					LOWER GEL	pH 8,8
10 ml	375 mM	2500,0 µl	1500 mM	\\	[Tris-HCl] resultante (LGB)	
10 ml	0,1 %	100,0 µl	10 %	\\	SDS	
10 ml	8 %	2541,7 µl	31,48 %	\\	ACRYL	
10 ml	0,025 %	25,0 µl	10 %	\\	APS >> adicionar por último	
10 ml	0,025 %	2,5 µl	100 %	\\	TEMED >> adicionar por último	
5,169 ml		4830,8 µl	H ₂ O-DD	>>> POLIMERIZAR a TA°C		

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	SDS-PAGE para VTG	
UPPER GEL					pH 6,8	
5,0 ml	125 mM	1250 μ l	500 mM	\\	[Tris-HCl] resultante (UGB)	
5,0 ml	0,1 %	50 μ l	10 %	\\	SDS	
5,0 ml	5 %	794 μ l	31,48 %	\\	ACRYL	
5,0 ml	0,1 %	50 μ l	10 %	\\	APS	>> adicionar por último
5,0 ml	0,1 %	5 μ l	100 %	\\	TEMED	>> adicionar por último
2,15 ml		2,85 ml	H ₂ O-DD	>>> POLIMERIZAR a TA°C		
LOWER GEL 2					pH 8,8	
2,5 ml	375 mM	625 μ l	1500 mM	\\	[Tris-HCl] resultante (LGB)	
2,5 ml	0,1 %	25 μ l	10 %	\\	SDS	
2,5 ml	7 %	556 μ l	31,48 %	\\	ACRYL	
2,5 ml	0,1 %	25 μ l	10 %	\\	APS	>> adicionar por último
2,5 ml	0,06 %	2 μ l	100 %	\\	TEMED	>> adicionar por último
1,23 ml		1,27 ml	H ₂ O-DD	>>> POLIMERIZAR a TA°C		
LOWER GEL 1					pH 8,8	
7,0 ml	375 mM	1750 μ l	1500 mM	\\	[Tris-HCl] resultante (LGB)	
7,0 ml	0,1 %	70 μ l	10 %	\\	SDS	
7,0 ml	9 %	2001 μ l	31,48 %	\\	ACRYL	
7,0 ml	0,1 %	70 μ l	10 %	\\	APS	>> adicionar por último
7,0 ml	0,06 %	4 μ l	100 %	\\	TEMED	>> adicionar por último
3,90 ml		3,10 ml	H ₂ O-DD	>>> POLIMERIZAR a TA°C		

UP

7 %

9 %

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	SOLUÇÕES DE TRANSFERÊNCIA, INCUBAÇÃO e LAVAGEM	
10 X = \\\					Tampão de Transferência (TT)	
1000 ml	25 mM	\\	\\	30,28	Tris-BASE (MM = 121,14 g/mol)	95 V a 0°C por 1 h mA =
1000 ml	192 mM	\\	\\	144,13	GLICINA (MM = 75,07 g/mol)	
1000 ml	20 %	200 ml	100 %	\\	Met-OH : adicione só na solução 1X (200 ml em 1 litro)	

>>> NO DIA: 200 ml Met-OH + 100 ml TT 10X + 700 ml H₂O-DD

			10 X = \\\		Salina tamponada com Tris (TBS)		pH 7,5
1000 ml	20 mM	\\	\\	24,23	Tris-BASE	(MM = 121,14 g/mol)	
1000 ml	500 mM	\\	\\	292,21	NaCl	(MM = 58,44 g/mol)	
1000 ml (1X)		100 ml +		900 ml H ₂ O-DD	>>> TBS 10 X: estoque do KIT		

TBS / Tween-20 (TTBS)

800 ml	1 X	800 ml	1 X	\\	TBS 1X	2,12500	
800 ml	0,10 %	0,800 ml	100 %	\\	Tween-20		

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	INCUBAÇÃO e LAVAGEM
21,25 ml		10	>> TIRAS (2,2 ml por TIRA de 4,25 cm ² = 0,85 x 5 cm): 0,5 ml.(cm ²) ⁻¹		

BLOQUEIO da membrana de nitrocelulose (NC)

21,25 ml	\\	\\	\\	\\	TBS		
21,25 ml	5 %	\\	\\	1,06	LEITE DESNATADO s/ FERRO		

>>> logo após transferência: imergir (lavar) NC em TBS e BLOQUEAR

> em SB com OSCILAÇÃO por 2 h a TA°C

VTG-		NITROCEL	>>> ADICIONAR PRIMÁRIO NO BLOQUEIO				
------	--	----------	------------------------------------	--	--	--	--

Solução com o policlonal primário - soro anti-VTG (1Ab)

21,25 ml	3000 T	7,08 µl	1 T	\\	soro anti-VTG CHAR		
----------	--------	---------	-----	----	--------------------	--	--

>>> INCUBAR NC com OSCILAÇÃO por 2 h a TA°C

1Ab \\ VTG-		NITROCEL	>>> LAVAR [(1) + 3X] com TTBS: 7 min., c/ OSCILAÇÃO a TA°C				
-------------	--	----------	--	--	--	--	--

V_f	C_f	V_i	C_i	m (g)	INCUBAÇÃO e LAVAGEM
21,25 ml		10	>> TIRAS (2,2 ml por TIRA de $4,25 \text{ cm}^2 = 0,85 \times 5 \text{ cm}$): $0,5 \text{ ml} \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$		

ANTICORPO SECUNDÁRIO conjugado com BIOTINA (2Ab)

21,25 ml	\ \		\ \	\ \	\ \	TTBS	
21,25 ml	3000	T	7,08 μl	1	T	2Ab	2Ab-BIOTINA

>>> INCUBAR NC com OSCILAÇÃO por 2 h a TA°C

>>> durante a incubação preparar o COMPLEXO que segue

BioT-2Ab \ \ 1Ab \ \ VTG-				NITROCEL	>>> LAVAR 3X com TTBS: 7 min., c/ OSCILAÇÃO a TA°C
---------------------------	--	--	--	----------	---

Complexo Streptavidina \ \ Biotina-Fosfatase alcalina (STREPT)

21,25 ml	\ \		\ \	\ \	\ \	TTBS	
21,25 ml	3000	T	7,08 μl	1	T	Streptavidina (KIT)	
21,25 ml	3000	T	7,08 μl	1	T	Fosfatase Alcalina Biotinilada (KIT)	

>>> INCUBAR o COMPLEXO por 1-3 h a TA°C (NÃO PASSAR de 3h)

>>> INCUBAR NC com OSCILAÇÃO por 2 h a TA°C

AP-BioT-STREPT \ \ BioT-2Ab \ \ 1Ab \ \ VTG-				NITROCEL	>>> LAVAR 5X com TTBS em excesso: 7 min., c/ OSCILAÇÃO a TA°C
--	--	--	--	----------	--

>>> 20 ml DE SOLUÇÃO DE COR

ANEXO 1**ESTUDOS COM A δ -ALAd DE PEIXES**

activity observed on day 2 could be due to a rapid increase of blood lead concentration occurring immediately after exposure. This inhibition, not subsequently observed, could disappear through the lack of lead accumulation in blood, the lead being removed by the liver and kidney during the time of the experiment. On the other hand, the similar decrease observed in control organisms suggests that another physiological factor could be influencing this enzymatic activity.

The results obtained in this experiment do not seem to be in agreement with many previous studies undertaken aimed at demonstrating that ALA-D activity is a good indicator of lead exposure in fish (Jackim, 1973; Davies et al., 1976; Hodson, 1976; Hodson et al., 1977; Schmitt et al., 1984, 1993; González et al., 1987; Rodrigues et al., 1989; Conner and Fowler, 1994; Nagakawa et al., 1998). Table 1 gives several references, where ALA-D enzyme activity has been investigated in tissues of fish exposed to lead, but it is emphasized that the results of these studies are controversial.

In general, all these studies have reported that ALA-D activity is depressed by lead exposure, but there is no known threshold Pb concentration that must be achieved to inhibit this enzymatic activity, indicating that within this taxa sensitivity is very different between various tissues of the same fish and in general across the taxa (Dieter and Finley, 1979; Wigfield et al., 1986; Blus et al., 1991; Hcnny et al., 1991). The data presented in our study cannot be compared with the data reported in the studies cited because different reference units were used by the authors and because the uptake routes were different. In fact, the uptake route, chosen to enhance the physiological response, could be further evidence of the wide variability of results on the effect of lead on ALA-D activity because it was not possible to demonstrate any direct dose–response relationship between injected lead concentration and the enzymatic activity at the concentration used.

Some hematological alterations related to hemoglobin synthesis and kidney disturbances (anemia, hemoglobin decrease, vacuolation, cariorrhesis, caryolysis, and pycnosis in red blood cells and presence of erythroplasts) were detected in Pb-treated toadfish and these alterations were more evident during the last days of the experimental period. These hematological pathologies may be related to Pb increases and to histopathological alterations in the kidney (especially in renal hematopoietic tissue and renal tubules). Similar hematological alterations were observed in toadfish treated with Hg at sublethal concentrations added to water (Sarasquete, 1982). According to many studies on the exposure of fish to heavy metals (Ortiz et al., 1999; Hamza-Chaffai et al., 1995; Arellano et al., 1999), the increase of lead concentration in the liver and kidney causes an evident degeneration of tissues at the histological level. These results, obtained using histological techniques, were not

Table 1
Relation of references from which the effect of lead on ALA-D activity in fish was reported

Reference	Lead concentration	Tissue	Experimental lead conc.	ALA-D activity inhibition	% inhibition ^a	Route uptake	Experimental time
Jackim (1973)	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Liver	10,000 ppb	+	18	Water, static system	14 days
		Liver	50,000 ppb	+	40		28 days
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Liver	10,000 ppb	+	66		7 days
		Kidney	10,000 ppb	+	58		7 days
Hodson (1976)	<i>Salmo gairdnerii</i>	Erythrocyte	13/23/38/66/143 ppb	+/+/+/+/+	40/40/35/35/74	Water, continuously flow	112 days
Hodson et al. (1977)	<i>Salmo gairdnerii</i>	Erythrocyte	10/18/31/50/92 ppb	+/+/+/+/+	40/40/40/40/65	Water, continuously flow	56 days
	<i>Lepomis gibbosus</i>	Erythrocyte	54/93/150/310/570 ppb	+/+/+/+/+	No data		28 days
	<i>Carassius auratus</i>	Erythrocyte	470 ppb	+	No data		7 days
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Erythrocyte	10/18/31/50/92 ppb	+/+/+/+/+	20/-/-/-/25		56 days
Johansson-Sjöbeck and Larsson (1979)	<i>Salmo gairdnerii</i>	Whole blood	10/75/300 ppb	+/+/+/+	21/74/86	Water, continuously flow	30 days
		spleen	10/75/300 ppb	+/+/+/+	27/51/64		30 days
		Head kidney	10/75/300 ppb	-/-/-/-	-		30 days
		Distal kidney	10/75/300 ppb	-/-/-/-	-		30 days
		Whole blood	500 ppb	+/+/+/+	-/27/40	Water, continuously flow	82 days
Krajnović-Ozretić and Ozretić (1980)	<i>Mugil auratus</i>	Whole blood	0.1/1 mM	+	50	In vitro	—
Rodrigues et al. (1989)	<i>Pinelodus maculatus</i>	Erythrocyte	5 mM	+	50	In vitro	—
		Liver	10 mM	+	50		—
Conner and Fowler (1994)	<i>Itialurus punctatus</i>	Liver	17.3 mM	+	50	In vitro	—
Nakagawa et al. (1998)	<i>Carassius auratus langsdorffi</i>	Erythrocyte	3/10/30 ppb	+/+/+/+	15/30/60	Water, continuously flow	21 days
Burden et al. (1998)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (juvenile)	Whole body	29/48/121/201 ppb	-/-/-/-	No data	Water, continuously flow	29 days

^a Percentage approximated.